Disbui. Düsseldorf

1985

Feldgees, Axel

UNIV.
LEIDEN
KM.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0118

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf.
gez.:
Dekan: Prodekan Professor Dr.Berger
Referent: Professor Dr.med.Feinendegen
Korreferent: Professor Dr.med.Schneider

Druck: H.Meier,Beckersstr.39-41,4o5o Mönchengladbach 2

Aus dem Institut für Nuklearmedizin der Kernforschungsanlage
Jülich, Labor für Zellbiologie

Direktor: Professor Dr. med. L.E. Feinendegen

Titel der Dissertation

EINWIRKUNG VON 7,12 DIMETHYLBENZANTHRACEN AUF DEN ORGANISMUS MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES BLUTBILDENDEN SYSTEMS.

Änderung der Proliferationsaktivität der Knochenmarksstammzelle und ihrer proliferierenden Nachkommenschaft während der frühen Phase der Leukämogenese.

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Axel Feldges

1985

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich beim Leiter des Instituts für Nuklearmedizin der Kernforschungsanlage Jülich, Herrn Professor Dr. med. L.E. Feinendegen, für die Themenstellung die Ermöglichung der Durchführung der vorliegenden Arbeit in seinem Institut und die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Herrn Professor Dr. K.H. von Wangenheim gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor, für den fachlichen Rat bei der Durchführung der Experimente sowie für die anregende Diskussion und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors für Zellbiologie, Fräulein M. Bröckling, Frau S. Fassbender und Herrn H.P. Peterson, die mir bei der praktischen Ausführung dieser Arbeit behilflich waren.

Außerdem möchte ich mich beim Leiter des cytopathologischen Instituts der Düsseldorfer Universität, Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Pfitzer und Frau Dr. med. Schmitt-Graef für ihre Hilfe bei der Herstellung, Färbung und Beurteilung der Milzschnitte bedanken.

Die Arbeit wurde durchgeführt im Institut für Nuklearmedizin der Kernforschungsanlage Jülich, Labor für Zellbiologie in der Zeit vom 1. Oktober 1981 bis zum 1. Oktober 1983.

Institutsleiter: Professor Dr. med. L.E. Feinendegen
Laborleiter: Professor Dr. K.H. von Wangenheim

Ich versichere hiermit eidesstattlich, daß diese Dissertation ohne unerlaubte Hilfe verfaßt wurde und mich auch keiner anderen Hilfsmittel als der in der Arbeit angeführten bedient habe. Außerdem versichere ich hiermit, daß diese Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Axel Feldges

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.2.	Der bisher bekannte Wirkungsmechanismus von 7,12 DMBA; eine Übersicht	2
1.2.1.	Chemische Eigenschaften von 7,12 Dimethylbenzanthracen	3
1.2.2.	Metabolisierung und Bioaktivierung von 7,12 DMBA	4
1.2.3.	Wechselwirkungen zwischen DNA und 7,12 DMBA	8
1.2.4.	Verteilung, Metabolisierung und biologische Wirkung von 7,12 DMBA auf Organe und Organsysteme	13
	- Haut	14
	- Lunge und Brustdrüse	15
	- Nebenniere und Gefäßsystem	16
	- Thymus, Milz, Knochenmark und peripheres Blut	16
2.	Material und Methoden	20
2.1.	Material	
2.1.1.	Tiere	20
2.1.2.	7,12 DMBA-Lösung	21
2.1.3.	Hanks Lösung	21
2.1.4.	Zellzählungen	21
2.1.5.	Bestrahlung	21
2.1.6.	Radioaktive Markierung der proliferierenden Zellen	22
2.1.7.	Messung der Radioaktivität	22
2.2.	Methoden	
2.2.1.	7,12 Dimethylbenzanthracen-Applikation	22
2.2.2.	Gewichtsmessungen	23
2.2.3.	Hämatologische Untersuchungen	23
2.2.4.	Histologische Untersuchungen	24
2.2.5.	Herstellung der Knochenmark - Zellsuspensionen	24

Seite

2.2.6. Milzkolonientest (CFU-S-Test) 24
2.2.7. Stammzell-Qualitätstest 26

3. Ergebnisse

3.1 Körpergewicht 29
3.2 Histologische Untersuchungen 29
3.3 Leukozytenzahl im peripheren Blut 31
3.4 Differential-Blutbild 32
3.5 Kernhaltige Knochenmarkszellen 32
3.6 CFU-S (colony forming units - spleen) im Femur 34
3.7. Qualitätstest und Proliferationsfaktor 38
3.7.1. ^{125}IUdR-Inkorporation und PF 3, 9 und 15 Wochen nach einer einmaligen DMBA-Applikation 38
3.7.2. ^{125}IUdR-Inkorporation und PF 3 Wochen nach viermaliger 7,12 DMBA-Applikation 41
3.7.3. ^{125}IUdR-Inkorporation und PF 3 Wochen nach achtmaliger 7,12 DMBA-Applikation 50
3.7.4. ^{125}IUdR-Inkorporation und PF 9 Wochen nach achtmaliger 7,12 DMBA-Applikation 54
3.7.5. Entwicklung des PF und der Verdopplungszeit proliferierender Zellen 3 und 9 Wochen nach ein- und mehrmaliger 7,12 DMBA-Applikation 57
3.8. Beziehung zwischen den CFU-S/Femur und dem Proliferationsfaktor 57

4. Diskussion 69
4.1. Aufbau und Funktion des hämopoietischen Systems 69
4.2. Reduktion des Proliferationsfaktors durch 7,12 DMBA 71
4.3. Zellverdopplungszeit und Zellverlust aus der Milz im Beobachtungszeitraum des Qualitätstests 74
4.4. Ursachen der Reduktion des Proliferationsfaktors durch 7,12 DMBA 76
4.5. Zusammenhang zwischen der Reduktion des Proliferationsfaktors und der CFU-S-Zahl 78

Seite

4.5.1. Diskrepanz zwischen inkorporierter Radioaktivität und CFU-S nach mehrmaliger DMBA-Applikation
1. Hypothese: Verschiebung des Verhältnisses zwischen CFU-S und CFU-C 79

2. Hypothese: Residualschaden im 1. Kompartiment 82

4.6. Mechanismus der Leukämogenese 84

4.6.1. Klinische Aspekte der Leukämie 84

4.6.2. Onkogene, Genproduktdosistheorie und Promotorinsertionsmodell 86

4.6.3. Möglicher Weg der Leukämieinduktion durch 7,12 DMBA 89

4.6.4. Endozelluläre Kontrolle von Zellproliferation und terminaler Differenzierung 90

4.6.5. Modell der Leukämogenese durch 7,12 DMBA 94

5. Zusammenfassung 97

6. Anhang 99

7. Literaturverzeichnis 112

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1	31
Tabelle 2	33
Tabelle 2a,2b	33
Tabelle 2b	34
Tabelle 3	35
Tabelle 4a,4b	36
Tabelle 4c	38
Tabelle 5a,5b	39
Tabelle 5c	40
Tabelle 6a,6b	45
Tabelle 6c	46
Tabelle 6d	47
Tabelle 7a,7b	51
Tabelle 7c	52
Tabelle 8a	54
Tabelle 8b,8c	55
Tabelle 9	58
Tabelle 10a	61
Tabelle 10b	62
Tabelle 11a	63
Tabelle 11b	65
Tabelle 12a	66
Tabelle 12b	66
Tabelle 13	99-101
Tabelle 14a,14b	102
Tabelle 14c	103
Tabelle 15a,15b	107
Tabelle 16a,16b	108
Tabelle 17a,17b	109
Tabelle 18a,18b	110
Tabelle 19a,19b	111

Abbildungen Seite

Abbildung 1a 3
Abbildung 1b 4a
Abbildung 2 9
Abnildung 3 30
Abbildung 4 37
Abbildung 5 42
Abbildung 6 43
Abbildung 7 44
Abbildung 8 48
Abbildung 9 49
Abbildung 10 53
Abbildung 11 56
Abbildung 12 59
Abbildung 13 61
Abbildung 14 62
Abbildung 15 64
Abhildung 16 65
Abbildung 17 67
Abbildung 18 68

UNIV. LEIDEN KSL

1. Einleitung

Klinische und experimentelle Beobachtungen weisen darauf hin, daß alle Blutzellen von einer gemeinsamen Stammzelle im Knochenmark abstammen. Das hämopoietische System kann in drei Kompartimente eingeteilt werden (72)* : Im ersten Knochenmarksanteil sind die undifferenzierten Stammzellen zu finden, die sowohl zu einer Selbsterhaltung als auch zu einer Weiterdifferenzierung in die verschiedenen Zell-Linien befähigt sind. Das zweite Kompartiment setzt sich aus reiferen Vorstufen zusammen, die jeweils schon für die Granulocytopoese, die Erythrocytopoese, die Thrombocytopoese und die Lymphocytopoese festgelegt sind. Diese determinierten Zellen sind durch humorale Regulatoren wie das Erythropoetin beeinflußbar. Das dritte Kompartiment beinhaltet ausgereifte Zellen der verschiedenen Zell-Linien, die die Fähigkeit zur Proliferation endgültig verloren haben (ausgenommen Lymphocyten). Zwischen den drei Knochenmarksanteilen bestehen fließende Übergänge. In der Entwicklung einer Zelle von der Stammzelle über die Zwischenstadien bis zur ausgereiften Endzelle laufen Proliferation und Reifung über bestimmte Zeitabschnitte parallel. Das Cancerogen 7,12 Dimethylbenzanthracen (7,12 DMBA) induziert bei Mäusen nach kurzer Latenzzeit unter anderem Leukämien. Aufgrund der experimentellen Ergebnisse ist eine enge Korrelation zwischen der Leukämogenese durch 7,12 DMBA und der gleichzeitigen Schädigung des genetischen Materials der Zelle durch das Cancerogen zu vermuten. Die Messung des durchschnittlichen Zellschadens und des Schädigungsverlaufes gestaltete sich bisher schwierig und war mit den üblichen Methoden nur ungenau möglich.

Der Stammzellqualitätstest (kurz: Qualitätstest) ermöglicht die Erfassung der akuten und chronischen Schädigung der Knochenmarksstammzelle und ihrer proliferierenden Nach-

---

* die in Klammern stehenden Ziffern beziehen sich auf das Literaturverzeichnis auf Seite 112

kommenschaft (47a) durch das leukämogene 7,12 DMBA. Dabei wird die Proliferationsrate der hämopoietischen Spenderzellen in regenerierenden Empfängermilzen untersucht. Voraussetzung für diesen Test ist die Möglichkeit, die proliferative Aktivität der Zellen durch Inkorporation des ^{125}IUdR ($5-^{125}$Iodo-2-desoxyuridin) zu messen, das an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Die von dem ^{125}J abgegebene Gammastrahlung ist leicht meßbar und proportional zur Zahl der in der S-Phase befindlichen Zellen (91). Die Messung der Proliferationsaktivität beruht auf der Zuwachsrate der ^{125}IUdR-Inkorporation zwischen dem dritten und fünften Tag nach der Transfusion von syngenen Knochenmarkszellen in letal bestrahlte Empfänger. Dabei besteht zwischen der Zahl der transfundierten Zellen und der ^{125}IUdR-Inkorporation der Milz am dritten und fünften Tag eine Linearität (47a). Der durchschnittliche ^{125}IUdR-Aktivitätszuwachs im Beobachtungszeitraum erlaubt die Berechnung eines Proliferationsfaktors. Die Reduktion des Proliferationsfaktors und die entsprechende Zunahme der Zellverdopplungszeit sind Ausdruck eines Restschadens der Stammzellpopulation und ihrer proliferierenden Nachkommenschaft.

Gleichzeitig wird der Milzkolonietest (synonym: CFU-S-Test) durchgeführt (101). Bei diesem Testverfahren ist es möglich, aufgrund der Anzahl der auf der Milzoberfläche sichtbaren Zellkolonien (sieben Tage nach der Transfusion syngener Knochenmarkszellen in letal bestrahlte Empfänger) die Knochenmarksstammzellanzahl zu ermitteln.

1.2. Der bisher bekannte Wirkungsmechanismus von 7,12 DMBA; eine Übersicht

In dieser Arbeit wird untersucht, wie sich die Proliferationsaktivität der Knochenmarksstammzelle und ihrer sich teilenden Nachkommenschaft in der Frühphase einer durch 7,12 DMBA induzierten Leukämie verändert. Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise dieses Cancerogens werden die Eigenschaften von 7,12 DMBA und seine Metabolisierung im Gesamtorganismus einleitend erläutert. Auch die genetischen Mechanismen, die zur Auslösung eines Tumorwachstums führen könnten, werden angesprochen.

1.2.1. Chemische Eigenschaften von 7,12 Dimethylbenzanthracen

7,12 Dimethylbenzanthracen (7,12 DMBA, Abb. 1a) wurde schon Anfang der dreißiger Jahre isoliert und dessen hohe Cancerogenität festgestellt (24).

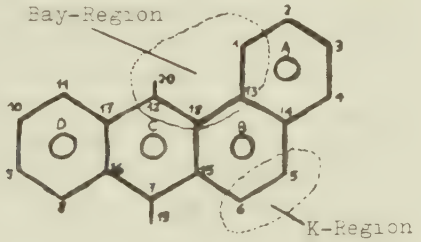


Abb. 1a: 7,12 Dimethylbenzanthracen (7,12 DMBA) mit den für die Epoxidbildung wichtigen Regionen. Modifiziert nach (33)

Dieser polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoff weist darüber hinaus noch eine hohe Zytotoxizität und Teratogenität auf (26). Das Molekulargewicht beträgt 256, und der Schmelzpunkt liegt bei 122 - 123°C (7). Das Molekül zeigt keine planare Konfiguration: Die Methylgruppe am Kohlenstoffatom 12 (C_{12}) bedingt durch intramolekulare Spannungskräfte, daß der A-Ring aus der Planarebene gedrückt wird (71). Die Instabilität des Moleküls wird auch durch Spannungen in den Kohlenstoffbrücken zwischen Ring A und Ring B, in der C_{10}-C_{11} und in der C_{12}-C_{17}-Bindung verursacht (41). Es sind zwei Regionen für das Verständnis der chemischen und biologischen Wirkungsweise von 7,12 DMBA von Bedeutung:

1. Die K-Region um die C_5-C_6-Bindung
2. Die "Bay-Region", die sich von C_{12} über C_{13} bis C_2 erstreckt (Abb. 1a).

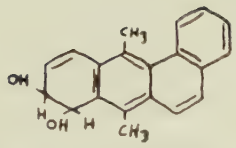
Die K-Region weist die höchste Elektronendichte auf, die C_5-C_6-Bindung ist die kürzeste im ganzen Molekül (55). Chemische Reaktionen in dieser Region werden durch die Methylgruppe am C_7 und deren sterischen Wechselwirkungen stark beeinflußt. Wird beispielsweise 7,12 DMBA-cis-5,6-diol unter

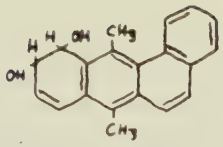
Säureeinwirkung dehydratisiert, so entsteht ausschließlich das 5-Phenol. Die Position C_6 wird sterisch behindert (durch Methylgruppe am C_7), so daß ein entsprechendes 6-Phenol nicht entstehen kann (67). Das K-Region-Epoxid (DMBA-5,6-Epoxid) weist gegenüber anderen Epoxiden eine relativ hohe Stabilität auf (54), so daß es bezüglich seiner chemischen und biologischen Eigenschaften genauer untersucht worden ist. Lange Zeit galt dieses Epoxit als die cancerogene Wirksubstanz des 7,12 DMBA, die als elektrophiles Agens mit den nukleophilen Nukleinbasen oder Eiweißen reagiert und so die Cancerogenese in Gang setzt (5). So reagiert 7,12 DMBA-5,6-epoxid mit Polyguanin in der Weise, daß C_5 oder C_6 sich kovalent an die Aminogruppe des N_2-Atoms des Guanins bindet (52). Überraschenderweise wird hier die C_5-Position nicht bevorzugt. In letzter Zeit gewann das Bay-Region-Epoxid (DMBA-1,2-epoxid) als cancerogene Wirksubstanz immer mehr an Bedeutung. Es gilt als wahrscheinlich, daß das DMBA-5,6-epoxid nicht das entscheidende cancerogene Agens ist und nur aufgrund seiner relativen Stabilität und besseren experimentellen Handhabung bevorzugt beziehungsweise überbewertet wurde. Das 7,12 DMBA-3,4-dihydriol-1,2-epoxid wird als die effektive cancerogene Form des DMBA angesehen und konnte in in-vivo-Versuchen (bei der Metabolisierung in Rattenleber-Hepatozyten, (23)) nachgewiesen werden. Auch seine Interaktion mit der DNA wurden untersucht (22). Im Kapitel 1.2.3. wird darauf noch näher eingegangen (S. 8).

7,12 DMBA zerfällt unter Licht- und Sauerstoffeinwirkung in ein Endoperoxid (7,12-Epidioxy-7,12 DMBA), das selbst transformatorische Eigenschaften auf Zellkulturen besitzt (108). Eine Photooxidation kann durch die Herstellung einer Fettemulsion (87) oder einer DMSO (Dimethylsulfoxyd)-Lösung (95) verhindert werden.

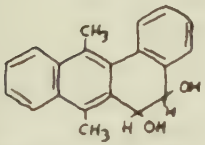
1.2.2. Metabolisierung und Bioaktivierung von 7,12 DMBA

Als lipophile Substanz penetriert, 7,12 DMBA gut durch biologische Membranen. Appliziert man die 7,12 DMBA-Fettemulsion intraperitoneal, so wird die Substanz sowohl durch die subserösen Lymphbahnen als auch durch die "Saftspalten" der Bauch-

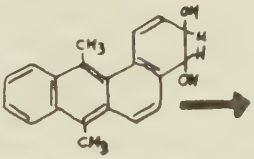




DMBA-t-8,9-dihydriol + DMBA-t-10,11-dihydriol (8,5 : 1,5) M: 11%
K: 9%

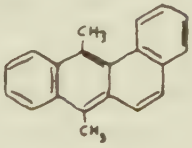


DMBA-t-5,6-dihydriol M: 5%
K: 3%

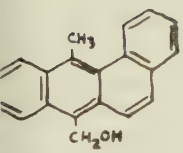


DMBA-t-3,4-dihydriol M: 3%
K: 5%

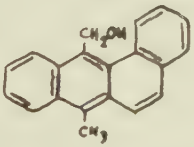
DMBA-t-3,4-dihydriol-1,2-epoxid



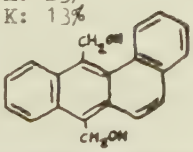
7,12 DMBA



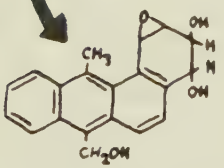
droxy-12-methyl M: 23%
anthracen. K: 13%



7-methyl-12-hydroxy M: 17%
benzanthracen K: 13%



7,12-dihydroxymethyl M: 1%
benzänthracen K: 1%



7-hydroxymethylbenz 3,4-dihydriol-1,2-epoxidanthracen

. 1b: Metabolisierung und Biotransformation von 7,12 DMBA in der Leber M=mikrosomale Rate K=Kernrate Zahlen nach (23)

organe aufgenommen. Hinsichtlich der Wirkung gegenüber dem Organismus unterscheidet sich diese Applikationsweise nicht von einer intravenösen Injektion (56). Nach einer i.p.-Injektion von DMBA findet man bei C57 black Mäusen fünf Tage nach einer Dosis von 1,5 mg DMBA einen Abfall der Lymphozyten im peripheren Blutbild auf 21% der Kontrolle beziehungsweise zehn Tage nach derselben Injektion sogar einen Abfall auf 10% der Kontrolle (85). Daneben sieht man eine akute Peritonitis mit einem sterilen, milchigen Exsudat, das neben polymorphkernigen Granulozyten auch Lymphozyten und einige Monozyten aufweist. Ab dem zehnten Tag nach der Applikation findet man mehr oder weniger starke Adhäsionen im Peritonealraum (85). Nach der Verteilung im Organismus wird 7,12 DMBA in vielen Organen verstoffwechselt. Im Vordergrund steht aber die Metabolisierung in der Leber. Die Abbildung 1b gibt über die verschiedenen Metabolisierungswege einen Überblick. In der Leber wird zunächst durch ein Monooxygenasesystem eine der beiden Methylgruppen oder beide hydroxyliert. Die Monooxygenasen sind sowohl im endoplasmatischen Retikulum als auch in der Kernmembran anzutreffen (23). Es werden mindestens zwei verschiedene Monooxygenasen unterschieden:

1. Die erste Monooxygenase besitzt das Coenzym Cytochrom-P-448. Es ist durch 3-Methylcholanthren induzierbar. Dieses Enzym setzt 7,12 DMBA unter anderem in das Non-K-Region-7,12-DMBA-trans-8,9-dihydriol um. Es hydroxyliert 7,12 DMBA preferentiell an der Methylgruppe (23).

2. Die zweite Monooxygenase weist als Coenzym Cytochrom-P-450 auf. Hier kann Phenobarbital eine höhere Aktivität induzieren. Durch seine Einwirkung entsteht unter anderem das K-Region-7,12-DMBA-trans-5,6-dihydriol. Auch wird das terminale Cancerogen DMBA-trans-3,4-dihydriol durch dieses Enzym gebildet (23).

Insgesamt weisen die Kernenzyme nur 5 - 20% der Aktivität der mikrosomalen Monooxygenasen auf. Das 7-Hydroxy-12-methylbenzanthracen, ein wesentlicher Metabolit, wird langsamer weiterverarbeitet als die Muttersubstanz. Es ist denkbar, daß die Hydroxylierung der Methylgruppe die Bindung des Substrates an

die aktive Seite des Cytochromkomplexes erschwert. Auch wird die Lipidlöslichkeit des Cancerogens durch die Einführung einer polaren Gruppe geringer und damit die effektive Substratkonzentration kleiner. Demgegenüber steigt nach der 7-Hydroxylierung die Wahrscheinlichkeit, daß das Substrat selektiv zu dem Trans-3,4-dihydriol, der metabolischen Vorstufe des Bay-Region-3,4-dihydriol-1,2-epoxids, umgesetzt wird (23). Die Epoxidation der polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe geschieht einheitlich durch Oxygenasen, die anschließende Hydratation zu Trans-dihydriolen durch Epoxidhydratasen und die Synthese der Diol-epoxide durch angekoppelte Oxygenasen. Der Enzymkomplex besteht unter anderem aus einer NADPH(Cytochrom-P-450)reductase und einer terminalen Cytochrom-P-450-oxidase. Allgemein wird die Monooxygenierung quantitativ durch die verschiedensten Faktoren beeinflußt: Species, Geschlecht, Alter, hormoneller Status und Ernährungszustand bestimmen die Metabolisierungsraten wesentlich mit (33). Als Beispiel für diese modifizierenden Faktoren sei das 17-β-Östradiol erwähnt. Es hemmt die Epoxidation von 7,12 DMBA, beeinflußt aber nicht die weitere Biotransformation der Epoxide (15). Nachdem 7,12 DMBA in seine verschiedenen Oxidationsprodukte überführt worden ist, werden diese im Rahmen der Biotransformation an Trägermoleküle wie Glutathion, Glucuronsäure und Schwefelsäure konjugiert. Diese wasserlöslichen Produkte werden dann größtenteils über die Galle ausgeschieden. Khanduja et al. (58) injizierten weiblichen Ratten 0,5 mg radioaktiv markiertes 7,12 DMBA in die Schwanzvene. Innerhalb von drei Stunden wurden schon 40% des Cancerogens über die biliäre Route ausgeschieden. Wurden die Ratten zuvor mit 3-Methylcholanthren behandelt, stieg die Rate auf 50% der Gesamtmenge. Dabei finden sich vorwiegend Dihydriole, die überwiegend in glucuronisierter Form vorliegen. 12-Hydroxymethyl-7-Methylbenzanthracen scheint an andere Moleküle als die obengenannten Träger gebunden zu werden. Zumindest stellt es ein ungeeignetes Substrat für die üblichen Transferasen dar (33). Das 7,12 DMBA-5,6-epoxid wird prefentiell an Glutathion konjugiert, wobei dann ein Mercaptursäureester entsteht. Die Esterbindung befindet sich am C_5 in der

K-Region. Das 8,9-Epoxid weist eine höhere Affinität zur mikrosomalen Epoxidhydratase als zur Glutathion-S-Epoxid-Transferase auf, so daß es vor der Ankoppelung an ein entsprechendes Trägermolekül erst zum 8,9-Dihydriol umgesetzt wird (14). Ein spezifisches Leberprotein bei der C3H-Maus (h-Protein) bindet 7,12 DMBA nur covalent, spielt aber bei der Detoxifikation durch die Transferasen keine Rolle (84). Die Konjugation kann durch Phenobarbital beeinflußt werden. Schlede et al. (86) stellten eine gesteigerte biliäre Exkretion von Benzopyrenprodukten nach Vorbehandlung mit Phenobarbital über vier Tage fest. Dies geschieht durch eine Stimulation der Konjugationsreaktion, die Phenobarbital über einen noch unbekannten Mechanismus bewerkstelligt. Ähnliches kann auch für die Konjugation von 7,12 DMBA-Produkten angenommen werden.

1.2.3. Wechselwirkungen zwischen DNA und 7,12 DMBA

Die Hypothese von Miller et al. (68), daß Carcinogene beziehungsweise ihre metabolisch aktivierten Derivate als elektrophile Agentien mit den nucleophilen Teilen von Nukleinsäuren und Proteinen sich kovalent binden und damit die Entstehung eines Tumors initiieren, hat sich durch viele Untersuchungsergebnisse untermauern lassen. Der Reaktionsmechanismus dieser Interaktionen zwischen 7,12 DMBA und der DNA wurde am relativ stabilen K-Region-Epoxid (7,12 DMBA-5,6 - Epoxid) näher untersucht (52). Das Epoxid wurde mit verschiedenen Polynukleinsäuren für 18 Stunden inkubiert, wobei es nur mit Polyguanin nennenswert reagierte (12). Es entstanden zwei Paare von Diastereoisomeren:

1. 5-Hydroxy-6-Guanin-7,12 DMBA
2. 5-Guanin-6-Hydroxy-7,12 DMBA (52).

Die Hydroxy-Gruppe steht in allen vier Formen trans zum Guaninrest, der über die 2-Aminogruppe mit 7,12 DMBA verbunden ist. Diese Reaktion kann ohne größere Störungen der nativen DNA-Struktur ablaufen, indem sich das 7,12 DMBA-Molekül in die Minorgrube der Doppelhelix einpaßt. So geeignet das 5,6-Epoxid für die Darstellung der Reaktionsmechanismen zwischen 7,12 DMBA und der DNA ist, so ist doch seine Rolle als terminales Cancerogen sehr unwahrscheinlich. Flesher et al. (38) stellten beispielsweise fest, daß dieses Epoxid eine geringere onkogene Potenz bei der Erzeugung von Sarkomen bei der Ratte aufwies als die Muttersubstanz selbst. Dieses Resultat und auch andere Studien lassen vermuten, daß die metabolische Transformation von 7,12 DMBA über das K-Region-Epoxid eher einen Schritt im Rahmen der Detoxifikation darstellt (33). Mit Tritium markiertem 7,12 DMBA konnten Blackburn et al. (10) bei der mikrosomalen Induktion eine Bindung der 7-Methylgruppe an die DNA ausschließen. Demgegenüber wird bei der photochemischen Induktion bis zu 29% des Cancerogens über diese Methylgruppe an die DNA gebunden.

Vieles spricht dafür, daß das Bay-Region-Epoxid eine entscheidende Rolle bei der Initiierung eines Tumors spielt. So fanden Moshel et al. (69) bei kultivierten Mäuseembryozellen nach einer Exposition mit 7,12 DMBA das polyzyklische

aromatische Hydrocarbon über den A-Ring an die DNA kovalent gebunden (Abb. 2).

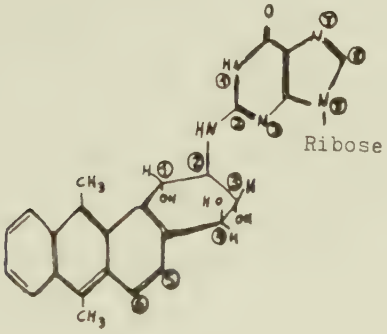


Abb. 2: Struktur und sterische Anordnung der 7,12-DMBA-t-3,4-dihydriol-1,2-epoxid-guanosinverbindung als Modell für die Interaktion des Cancerogens mit der DNA.

Als Zwischenprodukt stellte sich ein Dihydriol-Epoxid im A-Ring heraus. Vergleicht man die Kapazität einiger Dihydriole zur Erzeugung von Hauttumoren bei Mäusen (94), so zeigt das 3,4 Dihydriol des 7,12 DMBA eine überdurchschnittlich hohe Aktivität. Seine onkogene Potenz übertrifft die der Muttersubstanz um ein Vielfaches. Neben dem A-Ring scheint auch die 5-Position im Molekül für die Carcinogenität von Bedeutung zu sein. Das 5-Fluorderivat des 7,12 DMBA weist praktisch keine carcinogenen Eigenschaften auf (30). Es ist möglich, daß durch das Fluoratom am C_5 der Metabolismus an der "Bay-Region" gestört wird, etwa durch sterische Behinderung der Enzym-Substrat-Wechselwirkung. 7,12 DMBA verändert nicht nur die DNA-Struktur, es bewirkt auch eine Änderung der Reduplikationskinetik der DNA. Alfred und DiPaolo (4) untersuchten die mitotische Aktivität von Hamsterembryozellen in Kultur bei Einwirkung von 7,12 DMBA. So reduziert das Cancerogen die mitotische Aktivität um bis zu 50%, indem es die DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus blockiert. Nach 24-stündiger Einwirkung wurde die maximale Bindungsrate mit der DNA erreicht. Dabei banden sich im Durchschnitt 0,7 DMBA-Moleküle an 200000 Nukleotideinheiten.

Eine wichtige Voraussetzung für die Bindung der aromatischen Kohlenwasserstoffe an das genetische Material ist die sich aktiv replizierende DNA. So kann durch 1,2 Benzanthracen besonders während der S-Phase eine hohe Bindungsrate des 7,12 DMBA verhindert werden. Dies wird mit einer Induktion der hydroxylierenden Enzyme durch 1,2 Benzanthracen (3) in Zusammenhang gebracht. Diese aktivierten Enzyme könnten 7,12 DMBA zu Substanzen verstoffwechseln, die dann nicht mehr mit der DNA interagieren können. Brookes und Heidelberger (19) untersuchten, in welchem Verhältnis sich das Cancerogen mit den verschiedenen Makromolekülen der Zelle verbindet. Nach einer intraperitonealen Injektion von 7,12 DMBA wiesen die Zellen eines (schon vorher bestehenden) Ehrlich-Aszites-Tumor für die DNA eine fast doppelt so hohe Bindungsrate auf wie für die RNA und die Proteine, wobei die Proteine ihr Bindungsmaximum früher als die RNA erreichten. Die onkogene Transformation einer Zelle wird durch das Cancerogen eingeleitet, sie muß sich aber durch genetische Mechanismen (Mutation) manifestieren. Die Zellen mit dieser erworbenen Malignität können dann auf andere Organismen wie zum Beispiel auf Inzuchtlinien der gleichen Mäuse transplantiert werden: Marquardt et al. (66) transformierten Zellkulturen mit Hilfe von 7,12 DMBA-3,4-dihydriol und injizierten C3H/HeJ-Mäusen diese Tumorzellen. Fünf Wochen nach der Injektion entwickelten alle Tiere Sarkome, während die Kontrolltiere nach der Applikation normaler, kultivierter Zellen keine Tumoren zeigten. Die Änderungen in der Genanlage, die sich bei der Einwirkung des chemischen Cancerogens vollziehen, konnten zum Teil sichtbar gemacht werden. So wiesen Pal et al. (74) mittels der in-vitro-Induktion von SCE ("Sister Chromatid Exchanges") die hohe Aktivität des 7,12 DMBA-3,4-dihydriol nach. Der Austausch von Schwesterchromatiden läßt sich mit Hilfe von Bromuracil und einem Fluorochromfarbstoff darstellen (76).

Verwendet man das 7,12 DMBA-3,4-dihydriol als Cancerogen in diesem SCE-Test, so erzeugt es schon bei Konzentrationen um 0,5 µg/ml mehr SCE's als 7,12 DMBA mit einer Konzentration von 8 µg/ml. Steigt die Konzentration des 3,4-Dihydriols auf 2 µg/ml, so wächst die SCE-Rate um das fünffache (74). Kein anderes Dihydriol des 7,12 DMBA weist die-

se Aktivität auf.

Einige Untersuchungen weisen darauf hin, daß bestimmte Chromosomen bei der Einwirkung von 7,12 DMBA häufiger von SCE's und Chromatidenbrüchen betroffen sind. So fand Sugiyama (98) ein gehäuftes Vorkommen von Chromosomenbrüchen in Teilen der Chromosomen 1 und 2 von Rattenknochenmarkszellen bei der Exposition von 7,12 DMBA. Die betroffenen Genregionen gehören zum spät replizierenden, constitutiven Heterochromatin dieser Chromosomen und beinhalten größere Mengen repetitiver DNA, vielleicht ein Grund für die besondere Empfindlichkeit gegenüber den SCE's (57). Vergleicht man die SCE's/Zelle nach der intravenösen Applikation einer 7,12 DMBA-Lipidemulsion gegenüber den Kontrollzellen (57), so treten 25% mehr SCE's/Zelle als in der Kontrolle auf. Konzentriert man den Vergleich auf die Chromosomen 1 und 2, übertrifft die Verumgruppe die Kontrollgruppe sogar um 90%. Bei den empfindlicheren Chromosomen 1 und 2 korrelieren die SCE's mit ebenfalls dort stattfindenden Chromosomenbrüchen zu 46,9%, so daß beide Ereignisse in enger Beziehung zueinander zu stehen scheinen. Diese Korrelation entspricht auch den vorhergesagten Assoziationsfrequenzen, die aus Revell's Hypothese (79) folgen: Die Hypothese besagt, daß das primäre Ereignis nach einer ionisierenden Bestrahlung der DNA kein direkter Bruch, sondern eine lokale Instabilität ist. Erst wenn zwei solcher Läsionen zeitlich wie örtlich nahe aufeinander folgen, kommt es zu einem Austausch. Dieser Mechanismus kann auch für die Interaktion von chemischen Mutagenen mit der DNA angenommen werden (57). Alle Typen der Chromatidenaberrationen entstehen aufgrund eines kompletten Austauschvorgangs (79). Inkomplette Austauschaktionen innerhalb eines Chromatids führen zu Chromatidenbrüchen. Nach Revell's Vorhersage sind etwa 40% solcher Brüche mit einem Chromatidenaustausch assoziiert.

Die Folge von Chromatidenbrüchen können strukturelle Chromosomenaberrationen wie beispielsweise eine Robertson'sche Translokation sein. Zugleich treten durch Fehlverteilung von Autosomen Trisomien auf. So fand Sugiyama (97) bei einer durch 7,12 DMBA-Injektionen erzeugten Leukämie in 53,6% der Fälle eine Trisomie des Chromosoms 1. Die Leukämieform war zu 97,6%

vom "Lebertyp", der Rest waren Chloroleukämien und "Thymus-Typ-Leukämien". Der Lebertyp zeichnet sich durch eine Stammzell-Leukämie mit großen Proliferaten in der Leber und durch eine gleichzeitig auftretende Erythroblastose aus. Wie Sugiyama (97) hatte Huggins - er war mit Sugiyama der erste Beschreiber einer durch 7,12 DMBA erzeugten Leukämie (48) - bei Ratten durch mehrfach erfolgende Injektionen des Cancerogens preferentiell diesen Lebertyp einer Leukämie erzeugt. Das Erscheinungsbild der Chromosom 1 - Trisomie-Zellen wird als einheitlich beschrieben: Es handelt sich um unreife Zellen der erythropoietischen Reihe mit Reifungsrückstand auf der Stufe des polychromatischen Normoblasten (97). Daneben wurden auch einige Chromosom 6 - Trisomien bei der "Lebertyp - Leukämie" beschrieben.

Während bei Ratten die Trisomien der Chromosomen 1 und 6 im Vordergrund stehen, wird bei Mäusen nach 7,12 DMBA-Applikation vorrangig eine Trisomie des Chromosoms 15 beobachtet (110). Einschränkend muß gesagt werden, daß die Karyogramme der Ratte und der Maus nicht direkt vergleichbar sind. Die Ratte besitzt 42, die Maus 40 Chromosomen. Auch sind die Relationen zwischen akro- und metacentrischen Chromosomen voneinander abweichend. Wiener et al. (110) erzeugten bei C57bl/6J-Mäusen nach enteraler Applikation von insgesamt 4 mg 7,12 DMBA T-Lymphozyten - Leukämien. Die leukämischen Zellen wiesen zu mehr als 50% Trisomien des Chromosoms 15 auf. Zusätzlich fiel in einem Fall eine Robertson'sche Translokation zwischen Chromosom 1 und 17 auf. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß beim Burkitt-Lymphom des Menschen häufiger reziproke 8; 14 Translokationen vorkommen (60). Das Chromosom 14 enthält Gene für die H-Kette der Immunglobuline, auf Chromosom 8 befinden sich Informationen für die Steuerung der B-Lymphozytendifferenzierung.

Allen oben genannten Beispielen ist gemeinsam, daß die morphologische Manifestation eines Tumorgeschehens signifikant häufig mit Chromosomenaberrationen korreliert. Jede normale Zelle ist in der Lage, Schäden an der DNA mit Hilfe von Endo- und Exonucleasen, DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen zu

reparieren. Deshalb führt nicht jede Interaktion eines cancerogenen Agens mit der DNA automatisch zur Chromosomenaberration und damit möglicherweise zur Entstehung eines Tumors. Ahmed et al. (1) haben die DNA-Reparatur nach der Einwirkung von UV-Licht mit der nach DMBA-5,6-epoxid-Behandlung verglichen. Die Resultate lassen vermuten, daß sowohl die Angriffsorte der beiden cancerogenen Noxen als auch die darauffolgenden Reparaturmechanismen der Zelle verschieden sein müssen. So beträgt die Reparaturrate der durch das Epoxid geschädigten Zelle nur 25% derjenigen der mit UV-Licht bestrahlten Zelle. Bei beiden Zellkulturen wurden adäquate Dosen verwendet. Die kombinierte Anwendung beider Noxen hatte einen additiven Effekt, ein weiteres Indiz für die voneinander unabhängige Interaktion der cancerogenen Agentien mit der DNA. Dies gilt jedoch nur für gesunde Zellen, nicht für kranke - beispielsweise Xeroderma pigmentosum - Zellen. Bei dieser Erkrankung bedingt ein genetischer Defekt eine Konformationsänderung der Endonuklease, wodurch diese ineffektiv wird. Sie kann nach Einwirkung von UV-Licht entstandene Thymin-dimere nicht mehr mit derselben Geschwindigkeit entfernen wie es in einer normalen Zelle möglich ist. Im Gegensatz zur gesunden Zelle kann das 7,12 DMBA-5,6-epoxid bei der Xeroderma pigmentosum-Zelle die Endonuklease behindern, wodurch pro Zeiteinheit noch weniger Thymindimere entfernt werden (1). Es ist möglich, daß das Epoxid erst aufgrund der Konformationsänderung des Enzyms die Endonuklease sterisch behindern kann.

1.2.4. Verteilung, Metabolisierung und biologische Wirkung von 7,12 DMBA auf Organe und Organsysteme

Nach systemischer Applikation verteilt sich das Cancerogen im Organismus unregelmäßig. Kleihues et al. (59) fanden nach einer einmaligen intravenösen Injektion von 15 mg/kg 7,12 DMBA bei graviden Ratten, daß in Wechselgeweben und metabolisch hoch aktiven Organen das Cancerogen sich bevorzugt an die DNA band. Die Konzentration solcher 7,12 DMBA-DNA-Verbindungen war in Darm und Leber am höchsten, gefolgt von Lun-

ge, Milz, Niere und Gehirn. In den fetalen Organen lagen die Konzentrationen niedriger als in denen des Muttertiers. Nur im Zentralnervensystem zeigten sich umgekehrte Verhältnisse: Hier weist das fetale Gehirn eine 2,5 mal höhere Bindungsrate von 7,12 DMBA an die DNA auf. Dies ist möglicherweise Ausdruck der noch fehlenden Ausdifferenzierung des fetalen Zentralnervensystems und der Blut-ZNS-Schranke. Auch wenn 7,12 DMBA in hohem Maße transplazentar Tumoren erzeugen kann (80), scheinen die Epoxide nur in kleineren Mengen die Plazentarschranke zu passieren (59). So müssen die fetalen Gewebe einen wichtigen Beitrag zur Biotransformation des Cancerogens selbst beitragen, um die hohen Tumorraten im Fetus erklären zu können.

a) Haut

Die Haut der Maus ist sehr empfindlich gegenüber der cancerogenen Wirkung von 7,12 DMBA. Schon eine einmalige, lokale Applikation von 128 ng reicht aus, um Hautcarcinome zu erzeugen (93). Dabei verläuft die Aktivierung des Cancerogens ähnlich wie in der Leber. Bowden et al. (16) fanden in der Mausepidermis eine hochinduzierbare Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität (AHH), die durch 7,8 Benzoflavon gehemmt werden konnte (40). Auch entstanden durch die Einwirkung des 7,8 Benzoflavon keine Hauttumoren mehr (40); ein Beweis, daß AHH eine Schlüsselstellung in der Carcinogenese der Hauttumoren durch 7,12 DMBA besitzt. Im Gegensatz zum Leberstoffwechsel konnte durch 3-Methylcholanthren die Zusammensetzung der Metabolisierungsprodukte qualitativ nicht beeinflußt werden (32). Auch bei den Hautcarcinomen ist die Interaktion zwischen 7,12 DMBA und der DNA eine Conditio sine qua non (18). So hemmt Actinomycin D in einer Dosis von 84 µg das Entstehen von Hauttumoren durch 7,12 DMBA fast vollständig (45). Gleichzeitig geht die DMBA-DNA-Bindungsrate aber nur um 40% zurück. Dieser Rückgang allein erklärt die totale Blockierung der 7,12 DMBA-Tumorinduktion nicht. Es müssen noch weitere, wesentliche Schritte in der Tumorgenese gestört werden. Die Einwirkungsmöglichkeiten des Actinomycin D auf diesen Prozeß werden am ehesten durch die Beschreibung seiner Eigenschaften deutlich. Actinomycin D hemmt spezifisch

die DNA-dependent-RNA-Polymerase und wirkt darüber hinaus auf tierische Zellen direkt zytotoxisch (51). Zellen, bei denen es zu 60% doch zu einer Interaktion von 7,12 DMBA und DNA kommt, werden an ihrer Teilung durch Actinomycin D gehindert oder sofort zerstört. Die Folge ist eine totale Blockierung der Tumorgenese, obwohl zu 60% 7,12 DMBA an der genetischen Substanz gebunden bleibt.

b) Lunge und Brustdrüse

Auch menschliches Bronchialepithel setzt 7,12 DMBA katalytisch zu Metaboliten um, die sich an die DNA binden können (42). Eines der vorherrschenden Zwischenprodukte scheint wie in der Leber das 8,9-Dihydriol zu sein (75). Die Metabolisierungsrate ist aber geringer als in der Leber. Doch kann sie durch TCDD (2,3,7,8 Tetrachlorobenzo-p-dioxin) in einem höheren Maße gesteigert werden, als dies bei den hepatischen Enzymsystemen möglich ist (31).

Durch 7,12 DMBA werden in der Brustdrüse Adenocarcinome induziert, die von der Präsenz sowohl hypophysärer als auch ovarieller Hormone abhängig sind (27,46). Dao und Sinha (29) wiesen bei ihren Untersuchungen an Mammazellen in Kultur nach, daß die metabolische Aktivierung von 7,12 DMBA in der Brustdrüse selbst stattfindet, bevor dann dort Adenocarcinome entstehen. Doch unterscheiden sich die Enzymsysteme dort von denen in der Leber. Während die hepatische Metabolisierung die drei möglichen Hydroxymethylderivate entstehen läßt, fehlt in der Brustdrüse die Synthese von 7,12 Dihydroxymethylbenzanthracen (100). 3-Methylcholanthren führte in der Brustdrüse nur zu einer höheren Bildungsrate von 12-Hydroxymethyl-7-Methylbenzanthracen, während die Synthese von 7-Hydroxymethyl-12-Methylbenzanthracen sogar reduziert wurde. In der Leber wurden sämtliche Hydroxymethylderivate unter der Einwirkung von 3-Methylcholanthren vermehrt produziert. Die Incidenz der Brusttumoren, die durch 7,12 DMBA induziert wurden, konnte durch 3-Methylcholanthren nicht beeinflußt werden (28), während die Vorbehandlung mit Cumarin die onkogene Wirkung von 7,12 DMBA auf die Brustdrüse deutlich minderte (37).

c) Nebenniere und Gefäßsystem

Seit 1965 ist bekannt, daß die adrenolytische Wirkung von 7,12 DMBA hauptsächlich durch seinen Metaboliten, das 7-Hydroxymethyl-12-methylbenzanthracen, bewirkt wird (17). So fanden Sydnor und Flesher (99) nach der Einwirkung des oben erwähnten Metaboliten in der Zona reticularia und fasciculata der Nebennierenrinde fokale Parenchymnekrosen. Außerdem waren die Kapillaren maximal erweitert. In der Zona glomerulosa konnte erst mit höheren Dosen eine hämorrhagische Nekrose erzeugt werden. Bei erwachsenen Ratten fand Sims (92) neben dem vorherrschenden 8,9-Dihydriol auch das 7-Hydroxymethyl-12-Methylbenzanthracen als Metabolisierungsprodukt in den Nebennieren. Während die Nebennieren der erwachsenen Ratten also zur aktiven Biotransformation des Cancerogens befähigt sind, existiert bei Mäusen und unreifen Ratten diese Möglichkeit nicht (53). Entsprechend fehlt die adrenolytische Wirkung von 7,12 Dimethylbenzanthracen bei diesen Tieren. 3-Methylcholanthren schützt bei erwachsenen Ratten gegen die adrenolytischen Effekte des Cancerogens, kann aber auf der anderen Seite die Biotransformation von 7,12 DMBA nicht beeinflussen (92).

Im Gefäßsystem führt 7,12 DMBA zu spezifischen Veränderungen des Endothels. Albert et al. (2) fanden nach intramuskulärer Injektion von 25 mg/kg in der Aorta von Küken größere und zahlreichere atherosklerotische Läsionen als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Diese Plaques wiesen proliterativen Charakter auf. Überraschend war, daß der Serumcholesterinspiegel durch das 7,12 DMBA nicht verändert wurde. Beide letztgenannten Tatsachen ließen für die Autoren (2) die Möglichkeit zu, daß die atherosklerotischen Plaques gutartige Gefäßwandtumoren darstellten.

d) Thymus, Milz, Knochenmark und peripheres Blutbild

Schon 24 Stunden nach oraler Applikation von 133 mg/kg fällt das Thymusgewicht bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten, um nach 48 Stunden sein Minimum zu erreichen (20). Am neunten Tag post applikationem (p.a.) werden Normalwerte erreicht, aber bis zum 20. Tag p.a. sind die Thymusgewichte

der behandelten Ratten aufgrund erneuter Involutionen inkonstant. Uematsu (103) hat die histopathologischen Veränderungen in diesem Organ näher untersucht. Nach vier jeweils in zweiwöchigen Abständen applizierten, intravenösen Injektionen von 100 mg/kg 7,12 DMBA fand er bei weiblichen ddO-Mäusen eine Reduktion der Thymusrinde. Die Rindeninvolution wurde durch eine Verminderung der lymphoiden Zellen in den Lymphfollikeln verursacht. Die Gewichtsabnahme des Thymus war bei den Mäusen nicht so ausgeprägt wie bei den Ratten.

Die Milz reagiert auf eine 7,12 DMBA-Applikation schneller und stärker. Bereits nach einigen Stunden p.a. fiel das Gewicht der Rattenmilzen signifikant ab und erholte sich erst in der dritten Woche p.a. (20). Histologisch wurde die pathologische Veränderung erst 48 Stunden nach der Applikation manifest: Cawein und Sydnor (20) fanden in der weißen Pulpa die Lymphozyten in ihrer Anzahl und Größe vermindert. Einen noch stärkeren Gewichtsrückgang fand Uematsu (103) bei der ddO-Maus. 48 Stunden nach der ersten intravenösen 7,12 DMBA-Injektion fiel das Gewicht der Mausmilz bis auf 60% der Kontrolle, erholte sich aber schnell innerhalb einer Woche. Das histologische Bild unterschied sich deutlich von dem der Rattenmilz: Hier fiel besonders die Schädigung der myeloiden Zellen, die der erythropoietischen und granulocytischen Zelllinie angehören, auf. Die rote Pulpa war praktisch kollabiert, während in der weißen Pulpa keine signifikanten Änderungen festgestellt werden konnten.

Das Knochenmark zeigt drei Tage nach der 7,12 DMBA-Applikation bei den Ratten eine Reduktion der Myeloblasten und Promyelocyten (20). Viele Myelocyten zeigen Zeichen einer Reifungsstörung beziehungsweise -verzögerung (20). Die Retikulumzellen sind vermehrt und enthalten oft phagozytiertes Material. Am sechsten Tag p.a. ist eine erythrocytäre Hypoplasie festzustellen, während die restlichen roten Vorstufen megaloblastoides Aussehen annehmen. Eine Repopulation der roten Zellreihe geschieht am 12. Tag p.a., doch weist auch jetzt die granulocytische Zellinie einen Reifungsrückstand auf. Am 20. Tag p.a. zeigen alle Zellinien ein ausgeprägtes

Wachstum; die erythroiden Zellen sind sogar hyperaktiv. Seidel (89) hat die Verschiebungen innerhalb der einzelnen Zellreihen näher untersucht. Junge weibliche CBA/J-Mäuse erhielten 1 mg beziehungsweise 4x1 mg 7,12 DMBA im wöchentlichen Abstand oral. Die Knochenmarksausstriche wurden wie folgt klassifiziert: E_1-E_5 in der erythroiden Zellreihe, wobei E_1 der Proerythroblast und E_5 der kleinste, polychromatische Normoblast ist. M_1-M_8 in der granuloiden Zellreihe, wobei M_1 der Myeloblast und M_8 der reife neutrophile Granulocyt ist. Die M_1-M_4-Zellen werden zur proliferativen Gruppe und die M_5-M_8-Zellen zur nichtproliferativen Gruppe zusammengefaßt. Normalerweise ist das Verhältnis der M_1-M_4-Zellen zu den M_5-M_8-Zellen annähernd wie 1/4. In den ersten Tagen nach einer 7,12 DMBA-Applikation verschob sich das Verhältnis zugunsten der unreifen Zellen (1:3). Die Lymphozyten fielen vier Wochen p.a. auf 60% der Kontrolle, während die anfangs um 20% reduzierten Zellen der roten Zellreihe eine Hyperplasie zeigten. Die Knochenmarksveränderungen nach vier 7,12 DMBA-Applikationen verhielten sich ähnlich. Die Veränderungen im peripheren Blutbild spiegeln nur die Schädigung der Bildungsorte wider. Cawein und Sydnor (20) fanden keine Hinweise für eine direkte toxische Schädigung der ausgereiften Blutzellen durch 7,12 DMBA. So war am neunten Tag p.a. eine starke Thrombozytopenie (20% der Kontrolle) und am 15. Tag p.a. ein Rückgang des Hämatokrits auf 45% der Kontrolle feststellbar. Die Leukozytopenie am sechsten Tag p.a. betraf bei den Ratten sowohl die Lymphozyten als auch die Granulozyten, so daß die relativen Zellkonzentrationen der weißen Zellreihe sich nicht veränderten. Die Blutbilder der ddO-Mäuse verhielten sich anders. Uematsu (103) fand selbst nach vier 7,12 DMBA-Injektionen keine signifikante Reduktion der Erythrozyten über 49 Tage Beobachtungszeit. Die Leukozyten fielen nach jeder Injektion, erholten sich aber nur jeweils unvollständig, so daß sieben Tage nach der letzten Injektion die Leukozytenzahl nur noch ungefähr ein Drittel des Normwertes ausmachte. Diese Reduktion ging hauptsächlich auf Kosten der Lymphozyten. Die relativen Leukozytenkonzentrationen änderten sich hier im Gegensatz zu dem Blutbild der Ratten (20) signifikant. Cawein und Sydnor (20) fanden zusätzlich noch zwischen dem sechsten

und 15. Tag p.a. einen Abfall der sauren Phosphatase-Aktivität im Serum. Nach Oski et al. (73) führt eine Reifungsstörung innerhalb der Thrombozytopoiese zu einem Abfall der sauren Serumphosphatase. Ein gesteigerter Thrombozytenverbrauch im Rahmen einer Koagulopathie beispielsweise hat diesen Effekt nicht. Die oben erwähnte Thrombozytopenie ist folglich eine Konsequenz einer thrombozytopoietischen Reifungsstörung. Aufgrund der unterschiedlichen pathologischen Effekte von 7,12 DMBA auf die Blutbildungsorte bei der Maus einerseits und bei der Ratte andererseits sind die ebenfalls voneinander abweichenden Leukämieformen bei diesen Speciesgruppen nach ähnlichen Applikationsdosen verständlich. Während Huggins und Sugiyama (48) wie erwähnt bei Long-Evans-Ratten "Lebertyp-Leukämie" preferentiell erzeugten, waren "T-Zellen-Leukämien vom Thymus-Typ" bei C57 bl/6J-Mäusen (Wiener, 110) bei ddO-Mäusen (Uematsu, 103) und bei Wistar/H-Riop-Ratten (Peter et al., 78) die Folge von 7,12 DMBA-Behandlung.

Mit Hilfe des CFU-S-Testes, den Till und McCulloch (101) erstmals beschrieben, untersuchte Seidel (89) die Veränderungen in den Stammzellkompartimenten des Knochenmarks unter der Einwirkung von 7,12 DMBA. Eine einzelne perorale 7,12 DMBA-Applikation von 1 mg führte innerhalb eines Tages zu einer starken Reduktion (50 - 70% der Kontrolle) sowohl der pluripotenten CFU-S als auch der granulozytär geprägten CFU-C-Zellen. Bei den CFU-S hielt dieser Abfall mindestens zwei Wochen, bei den CFU-C mindestens vier Wochen an. Sechs Wochen p.a. war dann aber eine überschießende CFU-C-Konzentration im Femur feststellbar. Auch vier 7,12 DMBA-Applikationen von je 1 mg führten zu ähnlichen Entwicklungen, wobei Ansätze zur Regeneration zwischen der 3. und 4. Applikation abortiv verliefen. Die Stammzellkompartimente der Milz zeigten parallele Veränderungen, wenn auch ausgeprägter. Die CFU-S- und CFU-C-Konzentrationen in der Milz waren 2 - 3 Wochen nach der letzten 7,12-DMBA-Applikation sogar überschießend.

EXPERIMENTELLER TEIL

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tiere

Als Versuchstiere wurden weibliche C57 black/6J-Mäuse verwendet. Lieferanten für die Tiere waren die Lippische Versuchstierzucht Extertal und das Zentralinstitut für Versuchstiere Hannover. Die mit 7,12 Dimethylbenzanthracen (7,12 DMBA) behandelten Spendertiere waren 10 - 12 Wochen alt und gewöhnlich 19 - 25 g schwer. Die im Qualitätstest und im CFU-S-Test verwendeten Empfängertiere waren 10 - 12 Wochen alt. Um vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden beide Testverfahren jeweils simultan mit den Mäusen aus derselben homogenen Tiergruppe durchgeführt. Die Spendertiere wurden in Gruppen zu sechs Tieren in Plastikkäfigen gehalten und erhielten Futter (Marke "ssniff" - normale Diät - der Firma Plange Kraftfutterwerk Soest GmbH) und Sauerwasser ad libidum. Das Sauerwasser für die Empfänger im Qualitätstest enthielt zusätzlich 0,1% NaJ-Lösung, 0,5 g Neomycin, 0,5 g Tetracyclin und 25 g Sucrose pro Liter Trinkwasser (Carsten, persönliche Mitteilung). Das Sauerwasser hatte jeweils einen pH von 3. Die Antibiotika dienten zum Schutz der durch letale Bestrahlung infektgefährdeten Tiere. Neomycin und Tetracyclin haben auf die Proliferationstätigkeit der Knochenmark-Stammzelle in der erwähnten Konzentration und bei nur kurzzeitigem Gebrauch keinen signifikanten Einfluß. So konnte in separaten CFU-S-Versuchen mit Neomycin und Tetrazyklin keine signifikante Änderung der Milzkolonienzahl festgestellt werden (Neomycin: 252 $\pm$ 24,8/Sauerwasser: 228 $\pm$ 21,8 jeweils pro $1x10^6$ transfundierte Zellen). Das Natriumiodid wurde zur Auffüllung des Jodspeichers in der Schilddrüse verwendet, so daß bei der später erfolgenden radioaktiven Markierung mit ^{125}IUdR nur noch durch die proliferierenden Zellen im Organismus radioaktives Jod inkorporiert werden kann.

2.1.2. 7,12 DMBA-Lösung

Die Emulsion enthielt 5 mg 7,12 DMBA pro Gramm Lösung. Außerdem waren

15 % Baumwollsamenöl
1,2% gereinigtes Sojabohnenlecithin
0,3% Pluronic F-68 und
83 % Wasser

in der Emulsion enthalten. Die 7,12 DMBA-Lösung wurde uns freundlicherweise von der UPJOHN GmbH in Heppenheim zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Hanks Lösung

Die Knochenmarkszellen wurden mit Hanks Solution (Seromed München) aus den Femuren gespült. Hanks Solution diente auch als Medium zur Herstellung der zu transfundierenden Knochenmarkszellsuspensionen. Die Lösung enthält in mg/Liter:

NaCl	8000
KCl	400
$MgSO_4 7H_2O$	200
$CaCl_2$	140
$Na_2HPO_4 2H_2O$	60
KH_2PO_4	60
D-Glucose	1000
Phenolrot	17
$NaHCO_3$	368

2.1.4. Zellzählungen

Die Zellzählungen wurden mit einem elektronischen Zählgerät (Coulter Counter^R der Firma Coulter Electronics Limited) durchgeführt. Dabei wurden 20 µl Zellsuspension 200 µl Zaponin und 20 ml isotonischer Kochsalzlösung zugesetzt und mit der gemessenen Zellzahl dieser Lösung die ursprüngliche Zellkonzentration berechnet.

2.1.5. Bestrahlung

Die Bestrahlung der Empfängermäuse erfolgte in einer Gammacell 40 (Atomic Energy of Canada Limited, Commercial Products Ottawa, Canada), die als Radionuklid ^{137}Cs enthielt. Die ver-

wendete Gamma-Quelle hatte eine Dosisleistung von 145 rad/min. Die Bestrahlungszeit für die Empfängermäuse sowohl im CFU-S-Test als auch im Qualitätstest war 5,5 Minuten ≈ 800 rad.

2.1.6. Radioaktive Markierung der proliferierenden Zellen

Die proliferierenden Zellen wurden mit ^{125}IUdR der Firma New England Nuclear Boston, Massachusetts NEX 072 markiert. Die spezifische Aktivität betrug etwa 2000 Ci/mmol. ^{125}J zerfällt durch Einfang eines inneren Hüllenelektrons zu metastabilen ^{125}Te, wobei ein Energieüberschuß von 35,5 keV pro Zerfall entsteht. In 7% der Zerfälle wird ein Photon dieser Energie emittiert. Bei 93% der zerfallenden ^{125}J-Atome kommt es zur inneren Konversion. Die Energie der bei der inneren Konversion freiwerdenden Röntgenstrahlung wird entweder als Fluoreszenzstrahlung abgegeben oder auf äußere Hüllenelektronen übertragen, die als Auger-Elektronen emittiert werden. Da mehrfach Hüllenelektronen das Atom verlassen, entsteht vorübergehend ein mehrfach positiv geladenes Tellurion (13).

2.1.7. Messung der Radioaktivität

Die Milzen der Empfängermäuse wurden in einem Bohrloch-Szintillationszähler jeweils zweimal eine Minute lang gemessen und der Durchschnittswert in Counts per Minute (cpm) ermittelt.

2.2. Methoden

2.2.1. 7,12 Dimethylbenzanthracen-Applikation

Die weiblichen Spendertiere erhielten jeweils im Abstand von 2 Wochen eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml der oben beschriebenen 7,12 DMBA-Emulsion. Diese Menge entspricht 1 mg 7,12 DMBA. Die Applikation des Cancerogens wurde in einem eigens für diese Arbeit gebauten Plexiglasgehäuse unter einem Abzug durchgeführt. Dabei erfolgte die Injektion immer mit Schutzhandschuhen, die wie der übrige Abfall gesondert gesammelt und verbrannt wurden. Die Käfige wurden 24 Stunden danach unter Beachtung aller Vorsichtsmaßnahmen mit Schutzhandschuhen

gewechselt und dann verbrannt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich etwa noch 3,4% der ursprünglichen 7,12 DMBA-Menge im Organismus (58). Eine Gruppe der Mäuse erhielt nur eine Injektion (=1 mg DMBA), eine weitere vier Injektionen (=4 mg DMBA) und der dritten Gruppe wurde im Zeitraum von 14 Wochen insgesamt 8 mg DMBA appliziert. Die Kontrolltiere erhielten jeweils eine entsprechende Menge isotonischer Kochsalzlösung intraperitoneal. Die 7,12 DMBA-Gruppen umfaßten je 6 Tiere, bei der 8 mg-DMBA-Gruppe aufgrund der höheren Letalität bis zu 14 Tiere, während die Kontrollgruppen immer aus jeweils 6 Tieren bestanden.

2.2.2. Gewichtsmessungen

Die Spendermäuse sowohl der Kontroll- als auch der DMBA-Gruppen wurden in wöchentlichen Abständen gewogen. Die Werte der Verumgruppe wurden als Prozentsatz der Kontrollgruppenwerte angegeben.

2.2.3. Hämatologische Untersuchungen

Zu folgenden Zeitpunkten wurde eine Leukozytenzählung durchgeführt und entsprechend ein Blutausstrich angefertigt:

Anzahl der DMBA-Injekt.	Wochen nach der letzten Injektion	Anzahl der Untersuchungen
1	3	1
4	2	1
6	1	1
8	3	3
8	9	1

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion aus einer Schwanzvene. Die Leukozytenzählung wurde mit Hilfe des oben erwähnten Coulter Counters durchgeführt. Die Blutausstriche wurden nach Pappenheim gefärbt.

2.2.4. Histologische Untersuchung

Bei einer Maus fiel drei Wochen nach der achten intraperitonealen 7,12 DMBA-Injektion eine Splenomegalie auf. Die vergrößerte Milz wurde dem zytopathologischen Institut der Universität Düsseldorf zur histologischen Untersuchung zugeschickt. Von der Milz wurden mehrere Schnitte in verschiedenen Färbungen angefertigt und das zugrundeliegende Lymphom nach der Kieler Klassifikation beurteilt.

2.2.5. Herstellung der Knochenmark-Zellsuspension

Für den Qualitätstest und den CFU-S-Test wurde das Knochenmark wie folgt gewonnen: Die Femuren der Kontroll- und der DMBA-Spendertiere wurden unter sterilen Kautelen präpariert und in Hanks-Solution gewaschen. Dann wurden die Epiphysen entfernt und das Knochenmark jeweils mit 2 ml einer sterilen Hanks-Solution aus der Diaphyse aspiriert. Die Konzentration kernhaltiger Zellen in beiden Knochenmarkssuspensionen (Kontrolle und DMBA) ermittelte man mit Hilfe des Coulter Counters. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen: Die Suspension wurde jeweils zehn Minuten mit 1200 Umdrehungen/min = 266 g zentrifugiert, der zellfreie Überstand dekantiert und das Sediment erneut in Hanks-Solution suspendiert. Danach erfolgte die Einstellung der Knochenmarkssuspensionen auf die entsprechenden Konzentrationen für den Qualitätstest und den CFU-S-Test.

2.2.6. Milzkolonientest (CFU-S-Test)

Es wurde nach dem Verfahren, das von Till und McCulloch (101) 1961 beschrieben wurde, vorgegangen: Die Empfängermäuse werden vor der Transfusion mit 800 rad letal bestrahlt. Zwei Stunden danach wird den Recipienten die Knochenmarkstransfusionslösung injiziert. Ein Teil der in der Lösung befindlichen Zellen siedeln sich als Vorstufen der terminalen Blutzellen sowohl in der Milz als auch in den Knochenmarkshöhlen an und bilden sogenannte Zellkolonien. Nach (101) findet man 7 - 8 Tage nach der Zelltransfusion auf der Milzoberfläche der Empfänger knotenförmige Zellkolonien, die von Kno-

chenmark-Stammzellen abstammen sollen. Aufgrund der Anzahl der Kolonien pro Milz und der zuvor transfundierten Zellkonzentration kann man die CFU-S/Femur (colony forming units - spleen/Femur) ermitteln.

In dieser Arbeit wurde - wie allgemein üblich - der Prozentsatz der nicht in der Milz siedelnden Stammzellen (f-Faktor = CFU in der Milz 2 Stunden nach der Transfusion/CFU, die tatsächlich transfundiert wurden; Lahiri et al. (63)) nicht berücksichtigt. Die Transfusionslösung für den CFU-S-Test enthielt sowohl für die Verum- als auch die Kontrollgruppe 40000 kernhaltige Zellen/0,2 ml Lösung. Zwei Stunden nach der letalen Bestrahlung wurde den Recipienten jeweils 0,2 ml der Transfusionslösung (= 40000 Zellen) injiziert.

Die Gruppe der Empfängermäuse umfaßte mindestens zehn Tiere jeweils für die "DMBA-Knochenmarkszellen" und die "Kontroll-Knochenmarkszellen". Sieben Tage nach der Transfusion wurden die Mäuse getötet, die Milzen extirpiert und in Boùins-Lösung fixiert. Diese Lösung enthält zu 71,5% Pikrinsäure, zu 23,8% Formaldehydlösung und zu 4,7% Eisessig.

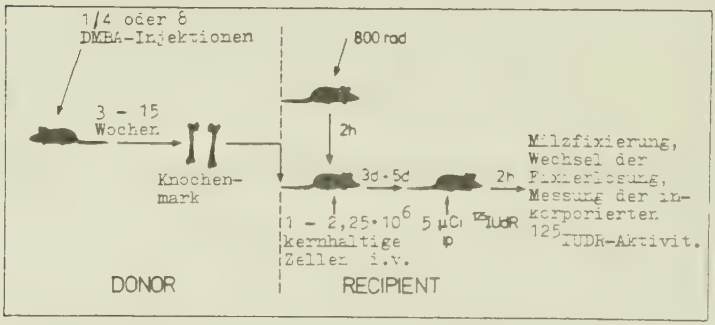
Die makroskopisch sichtbaren Milzkolonien bis zu einer Mindestgröße von 0,25 mm^2 Durchmesser wurden gezählt und daraus die CFU-S pro $1x10^6$ transfundierten Knochenmarkszellen beziehungsweise pro Femur der Spendermäuse ermittelt.

Zu folgenden Zeitpunkten wurde ein CFU-S-Test durchgeführt:

Anzahl der DMBA-Injekt.	Wochen nach der letzten Injektion	Anzahl der CFU-S-Teste
1	3	3
1	9	1
1	15	1
4	3	3
8	3	3
8	9	1

2.2.7. Stammzell-Qualitätstest

Dieses Verfahren wurde von Hübner, v. Wangenheim und Feinendegen 1981 erstmals beschrieben (47a): Siehe Versuchsschema



Schematische Darstellung des Versuchsplans: 7,12 DMBA-Behandlung der Donoren und STAMMZELL-QUALITÄTSTEST der Recipienten.

Für den Qualitätstest wurden drei verschiedene Transfusionslösungen hergestellt: $1x10^6$, $1,5x10^6$ und $2,25x10^6$ Zellen pro 0,2 ml Lösung. Die mit 800 rad bestrahlten Empfängermäuse erhielten jeweils 0,2 ml einer dieser drei Zellkonzentrationen durch die Schwanzvene injiziert. Je 12 Mäusen wurde eine der drei Konzentrationen (jeweils für DMBA und Kontrolle 12 Tiere) appliziert. Drei Tage nach der Transfusion wurde einer Hälfte der Empfänger 0,2 ml einer mit 0,9% isotonischer Kochsalzlösung verdünnten ^{125}IUDR-Lösung (Endkonzentration = 25 µCi/ml) intraperitoneal injiziert. Jede Maus erhielt also 5 µCi ^{125}IUDR, das dann in die DNA der proliferierenden Zellen als Thymidinanalogon eingebaut wurde.

Auch die in der Milz vorhandenen Zellproliferate, die einem Teil der transfundierten Knochenmarkszellen entstammen, nehmen entsprechend ihrer Proliferationsaktivität ^{125}IUdR auf.

Zwei Stunden nach der radioaktiven Markierung wurden die Tiere getötet, die Milzen extirpiert und in 4% Formaldehydlösung (pH 7) fixiert. In den darauffolgenden 48 Stunden

spülte man die Milzen zweimal mit 4% Formaldehydlösung, um nicht gebundene Radioaktivität zu entfernen. Danach wurde die in der Milz gebundene Radioaktivität in einem Bohrloch-Szintillationszähler gemessen. Mit der anderen Hälfte der Empfänger wurde am fünften Tag nach der Transfusion in derselben Weise wie oben für den dritten Tag beschrieben verfahren.

Der Qualitätstest erlaubt eine qualitative Aussage über die Proliferationsfähigkeit der Knochenmark-Stammzellen und ihrer Nachkommen, da zwischen dem Zuwachs an inkorporierter Radioaktivität in der Milz und der Zahl der transfundierten Zellen in der Zeit vom dritten bis zum fünften Tag nach der Transfusion (für die genannten Zellkonzentrationen) eine lineare Beziehung besteht (47a); als Beispiel siehe Abb. 5 Seite 42. Außerdem ist die gemessene Radioaktivität proportional zur Zahl der in der S-Phase befindlichen Zellen (91) und damit ein Maß für die in der Milz herrschende Proliferationsaktivität.

Werden die gemittelten cpm für die einzelnen Konzentrationen vom Tag 5 durch die cpm der entsprechenden Konzentrationen des dritten Tages dividiert, so erhält man den Proliferationsfaktor.

Der Faktor der DMBA-Gruppe wird als Prozentsatz des Kontrollgruppenwertes angegeben.

Der Qualitätstest wurde mit dem CFU-S-Test simultan zu folgenden Zeitpunkten durchgeführt:

Anzahl der DMBA-Injekt.	Wochen nach der letzten Injektion	Anzahl der Qualitätsteste
1	3	4
1	9	1
1	15	1
4	3	3
8	3	3
8	9	1

Es wurden in 3 Versuchsreihen insgesamt 13 Stammzellqualitätstests und 12 CFU-S-Tests durchgeführt. Dabei umfaßte ein Qualitätstest mindestens 80 Tiere, ein CFU-S-Test mindestens 20 Tiere.

Auch bei nicht transfundierten, letal bestrahlten Empfängertieren findet in der Milz noch eine abortive Vermehrung hämopoetischer Zellen statt. Dieser biologische Hintergrund betrug am dritten Tag nach Transfusion 310-389 cpm/Milz, am 5. Tag 550-737 cpm/Milz. Subtrahiert man diese Werte von den inkorporierten Aktivitäten in den Milzen transfundierter Mäuse, so beeinflußt diese Korrektur das Ergebnis an Tag 3 stärker als an Tag 5, weil die Empfängermilzen an Tag 5 eine 20-30fach höhere Inkorporation aufweisen. Je weniger Aktivität eine Milz am dritten Tag inkorporiert hat, desto stärker macht sich der Abzug des biologischen Hintergrundes bemerkbar: Der Proliferationsfaktor wird größer.

Die Proliferationsaktivität einer Empfängermilz scheint auch durch die Höhe der transfundierten Zellzahl beeinflußt zu werden: Nach Transfusion der doppelten Zellzahl steigt die Inkorporation nicht auf das Doppelte an (auch nach Berücksichtigung des biologischen Hintergrundes nicht). Vermutlich beeinflußt das Mikromilieu der Milz je nach Bedarf des Organismus den Proliferationsstimulus auf die Spender- und auf die Empfängerzellen. Der biologische Hintergrund entzieht sich somit einer genauen Erfassung und wurde daher bei Hübner et al. (47a) nicht berücksichtigt.

Zur Abschätzung des Einflusses des biologischen Hintergrundes auf den Proliferationsfaktor wurde bei den verschiedenen transfundierten Zellzahlen derselbe biologische Hintergrund abgezogen. Diese Korrektur änderte die statistische Signifikanz der Versuchsergebnisse nicht. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Darstellung der nach Abzug des biologischen Hintergrundes erhaltenen Daten verzichtet.

3. Ergebnisse

3.1. Körpergewicht

Das Cancerogen wurde intraperitoneal verabreicht, da nach einer einmaligen intravenösen Injektion die zarten Schwanzvenen der C57 bl Mäuse durch die Reizung und eine nachfolgende Obturation für weitere Applikationen unbrauchbar wurden. Ähnliche entzündliche Reaktionen zeigte auch das Peritoneum. Durch den in unterschiedlichen Mengen entstehenden Aszites waren die Körpergewichte größeren Schwankungen unterworfen (Abb. 3, S. 30). So stieg das Gewicht jeweils eine Woche nach der intraperitonealen 7,12 DMBA-Applikation unproportional stark an, um dann wieder leicht zu fallen.

Die größte Gewichtszunahme war in der 13. Woche mit 108% der Kontrolle zu verzeichnen (Abb. 3, Tabelle 14 im Anhang). Dieser Wert, eine Woche nach der 7. DMBA-Injektion, wurde auch nach der achten Dosis nicht mehr erreicht.

Hauptsächliche Ursache hierfür dürfte eine gewisse Selektion gewesen sein: So war die peritoneale Empfindlichkeit gegenüber dem Cancerogen innerhalb der Mäusepopulation unterschiedlich ausgeprägt. In der 13. Woche war die Letalitätsrate sehr hoch, so daß die Schädigung des Gesamtorganismus durch eine progrediente Gewichtsreduktion nun deutlich wurde. Insgesamt starben mehr als die Hälfte der Tiere aufgrund der ausgeprägten Aszitesentwicklung und den daraus folgenden Komplikationen.

3.2. Histologische Untersuchung

Bei einer Maus fiel drei Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion eine deutliche Splenomegalie auf. Das Körpergewicht betrug 19,50 g (Kontrolle 24,10±0,29 g), das Milzgewicht 163 mg (Kontrolle 80 - 100 mg). Auch die Leukozytenzahl lag mit 28300/mm^3 dreimal so hoch wie bei der Kontrolle. Im Blutausstrich fielen große, undifferenzierte Zellen der weißen Blutreihe auf. Das Kern-Plasma-Verhältnis war zugunsten des Kernes verschoben. Die histologische Untersuchung der Milzschnitte im zytopathologischen Institut der Universität Düsseldorf

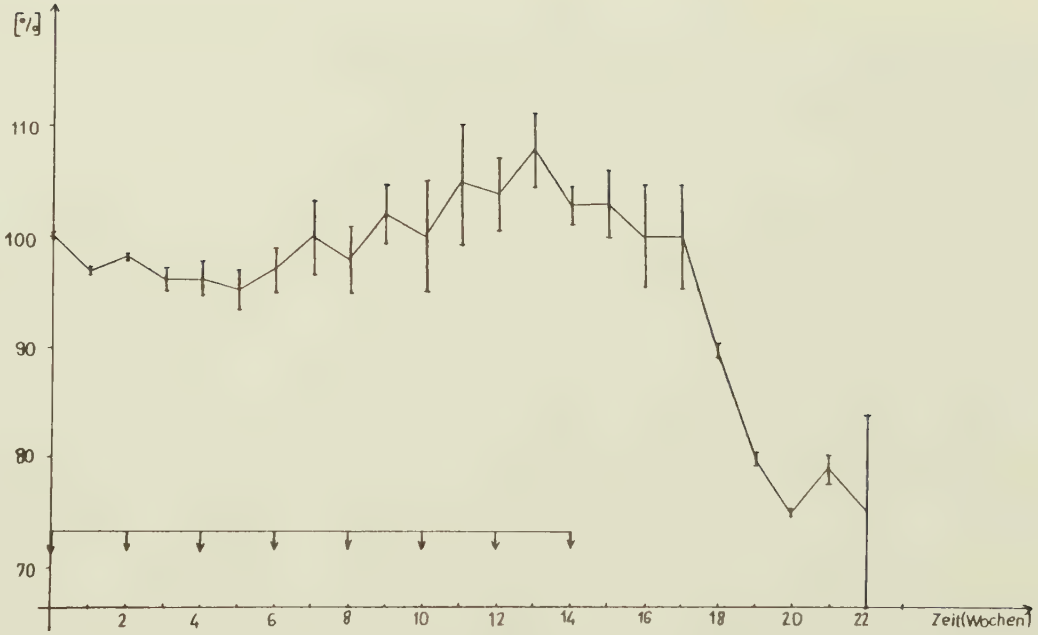


Abb. 3: Entwicklung der Körpergewichte unter 8 intraperitonealen DMBA-Injektionen von je 1 mg in 14-tägigen Abständen. Die Werte sind in % der Kontrolltier-Gewichte angegeben. Mittelwerte aus drei Versuchsreihen.
In allen Abbildungen stellen senkrechte Striche die Standardfehler (SE) dar, wenn sie größer als die gezeichneten Symbole sind.

ergab ein malignes Non-Hodgkin-Lymphom von hohem Malignitätsgrad, wahrscheinlich ein lymphoblastisches Lymphom nach der "Kieler Klassifikation".

3.3. Leukozytenzahl im peripheren Blut

Die Resultate der Tabelle 1 zeigen zweierlei Sachverhalte auf. Zum einen wird die akute Schädigung der Blutbildungsorte durch 7,12 DMBA deutlich.

Tabelle 1: Leukozytenzahl im peripheren Blut im Verlauf der 7,12 DMBA-Injektionen von 1 mg jeweils i.p. Die Injektionen erfolgten in der 0., 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14. Woche.

Zeitpunkt der Leukozytenzählung	Kontrolle Leukozyten/mm^3 $\bar{x} \pm SE$	7,12 DMBA Leukozyten/mm^3 $\bar{x} \pm SE$	% der Kontr.
3 Wochen nach einer 7,12 DMBA-Injektion	8500 ± 445	8250 ± 260	97%
2 Wochen nach der 1. 7,12 DMBA-Injektion	9225 ± 425	8340 ± 260	90%
1 Woche nach der 6. 7,12 DMBA-Injektion	11400 ± 390	6350 ± 795	58%
3 Wochen nach der 8. 7,12 DMBA-Injektion	7980 ± 245	6225 ± 735	78%
9 Wochen nach der 8. 7,12 DMBA-Injektion	4720 ± 120	2830 ± 330	60%

So war die Leukozytenzahl eine Woche nach der sechsten Injektion auf 58% der Kontrolle reduziert, während drei Wochen nach der achten Applikation die Werte nur auf 78% der Kontrolle fielen.

Der Zeitfaktor (1 Woche/3 Wochen) bezüglich der Erholungszeit scheint wichtiger als der Dosisfaktor (6 mg gegenüber 8 mg) zu sein. Trotzdem - das ist der zweite Sachverhalt - ist ein Spätschaden unübersehbar.

Neun Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion trat trotz der langen Erholungszeit eine Leukopenie von 60% der Kontrolle auf. Wichtig ist, daß drei Wochen nach der letzten Applikation

höhere Leukozytenzahlen als neun Wochen p.a. auftraten; also eine Reduktion zu einem Zeitpunkt, wo eine akute Schädigung wohl ausgeschlossen werden kann.

3.4. Differential-Blutbild

Drei Wochen nach einer einmaligen DMBA-Injektion wurde weder in der Anzahl noch in der relativen Zusammensetzung des weißen Blutbildes Veränderungen gefunden.

Zwei Wochen nach der vierten DMBA-Applikation war trotz der fast normalen Leukozytenzahl eine Verschiebung innerhalb des weißen Blutbildes unverkennbar. Das Verhältnis der Lymphozyten zu den Granulozyten verschiebt sich zugunsten der myeloiden Zellen. Diese Veränderungen sind jeweils kurz nach einer DMBA-Injektion noch ausgeprägter:

So wurde nur sieben Tage nach der sechsten Applikation des Cancerogens zu etwa 40% Lymphozyten, 40% reife Granulozyten und 20% unreifere, myeloide Vorstufen (Kontrolle: 80% Lymphozyten, 20% Granulozyten) gefunden.

Sowohl drei Wochen als auch neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion blieben die Lymphozyten reduziert. Auch nimmt die Zahl der reifen Granulozyten insgesamt ab, während die unreifen myeloiden Zellen und andere nicht eindeutig klassifizierbare Vorstufen mehr in den Vordergrund treten.

3.5. Kernhaltige Knochenmarkszellen

Das Knochenmark wies bezüglich der Zellularität drei Wochen nach einer intraperitonealen 7,12 DMBA-Injektion von 1 mg keine akuten Schädigungen durch das Cancerogen mehr auf (Tabelle 2).

Tabelle 2 : Kernhaltige Knochenmarkszellen in verschiedenen Zeitabständen nach jeweils einer intraperitonealen Injektion von 1 mg 7,12 DMBA
SE = Standardfehler*

Zeit nach einer DMBA-Injektion	Kontrolle kernhaltige Zellen/Femur	$\bar{x} \pm SE$	7,12 DMBA kernhaltige Zellen/Femur	$\bar{x} \pm SE$	% der Kontrolle
3 Wochen	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	109%
9 Wochen	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	112%
15 Wochen	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	92%

Neun Wochen nach der Injektion war sogar eine geringgradige Hyperplasie im Knochenmark festzustellen. So stieg dort die Anzahl der kernhaltigen Zellen auf 112% der Kontrolle, um in der 15. Woche p.a. wieder auf 92% abzufallen. Diese überschießende Regeneration trat auch bei der mehrmaligen Schädigung durch 7,12 DMBA auf (Tabelle 2a). Drei Wochen nach der vierten Applikation des Cancerogens übertrafen die behandelten Mäuse die entsprechenden Kontrolltiere um 20%.

Tabelle 2a: Kernhaltige Knochenmarkszellen 3 Wochen nach verschiedener Anzahl von 7,12 DMBA-Injektionen von 1 mg i.p.

Anzahl der DMBA-Injek. 1 mg i.p.	Kontrolle kernhaltige Zellen/Femur	$\bar{x} \pm SE$	7,12 DMBA kernhaltige Zellen/Femur	$\bar{x} \pm SE$	% der Kontrolle
1	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	109%
4	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	120%
8	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	9-%

* $SE = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}$

Nach acht Injektionen scheint die Zeit von drei Wochen nicht mehr auszureichen, um eine vergleichbare Hyperplasie zu entwickeln (Tab. 2a). Mit 98% der Kontrolle erreichte das Knochenmark bezüglich seiner Zellularität nur noch das Normniveau.

Erst neun Wochen nach der achten Applikation ist wieder eine Hyperplasie von 120% der Kontrolle feststellbar (Tab. 2b).

Tab. 2b: Kernhaltige Knochenmarkszellen neun Wochen nach einer beziehungsweise acht 7,12 DMBA-Injektionen von je 1 mg i.p.

Anzahl der DMBA-Injekt. 1 mg i.p.	Kontrolle kernhaltige Zellen/Femur	7,12 DMBA kernhaltige Zellen/Femur	% der Kontrolle
1	$19,9.10^6$	$22,2.10^6$	112%
8	$26,8.10^6$	$32,2.10^6$	120%

Die Zellularität des Knochenmarks erfährt also auch durch sehr hohe Dosen des Cancerogens keine dauerhafte Dezimierung.

3.6. CFU-S (colony forming units - spleen) im Femur

Nach der erstmals von Till und McCulloch (101) beschriebenen Methode wurde von der Anzahl der Milzkolonien am siebten Tag nach der Transfusion auf die Menge der Stammzellen im Spenderknochenmark rückgeschlossen.

Tabelle 3 zeigt die Entwicklung der CFU-S/Femur im Verlaufe einer 15-wöchigen Erholungszeit nach einer einzigen intraperitonealen DMBA-Injektion von 1 mg.

Tabelle 3: CFU-S/Femur 3, 9 und 15 Wochen nach jeweils einer 7,12 DMBA-Injektion i.p. Die Werte der Kontrollgruppen wurden auf $\bar{x}$ = 4000±355 CFU-S/Femur normalisiert und die entsprechenden Werte der Verumgruppe mit den resultierenden Faktoren multipliziert.

Zeit nach der DMBA-Injektion in Wochen	K O N T R O L L E		Normalisierungsfaktor	7,12 D M B A		
	$\bar{x}$ ± SE	Normalisiert		$\bar{x}$ ± SE	Normalisiert	% der Kontr.
3	3490 ± 62		1,1461	2752 ± 13	3154 ± 15	79%
9	3948 ± 202	4000 ± 355	1,3622	2462 ± 30	4535 ± 179	115%
15	3093 ± 165		1,2932	2374 ± 36	3435 ± 117	87%

Drei Wochen nach der Applikation des Cancerogens waren die CFU-S/Femur leicht reduziert, um sechs Wochen später mit 115% der Kontrolle ein Maximum zu erreichen. Die Differenzen zur Kontrolle sind aber nicht signifikant.

Auffallend ist die parallele Entwicklung zwischen der Anzahl der Knochenmarkszellen insgesamt (Tab. 2, S. 33) und der CFU-S im besonderen (Tab. 3).

Auch fiel fünfzehn Wochen nach der einmaligen DMBA-Injektion die Zahl der CFU-S/Femur entsprechend der Gesamtpopulation im Knochenmark.

Dennoch besteht eine gewisse Diskrepanz zwischen der CFU-S-Zahl und der Gesamtzellzahl im Knochenmark drei Wochen nach der einmaligen Applikation des Cancerogens. Die Anzahl aller kernhaltigen Knochenmarkszellen stieg zu diesem Zeitpunkt auf 109% der Kontrolle (Tab. 2, S. 33), während gleichzeitig die CFU-S mit 79% der Kontrolle (Tab. 3) reduziert waren.

Die undifferenzierten Zellen - CFU-S - scheinen akut gegenüber der Noxe empfindlicher zu sein als ihre entsprechenden Nachkommen mit einem höheren Differenzierungsgrad.

Der Rückgang der CFU-S/Femur fiel drei Wochen nach der vierten 7,12 DMBA-Injektion noch deutlicher aus. Zu diesem Zeitpunkt waren diese pluripotenten Zellen mit 53% der Kontrolle fast auf die Hälfte dezimiert (Tab. 4a und Abb.4*), während die Zellzahl/Femur mit 120% der Kontrolle überdurchschnittlich hoch war (Tab. 2a, S. 33).

Tabelle 4a: CFU-S/Femur drei Wochen nach der vierten 7,12 DMBA-Injektion i.p. Die Werte der Kontrollgruppe wurden auf $\bar{x}$ = 4000 ± 355 CFU-S/Femur normalisiert und die entsprechenden Werte der Verumgruppe mit dem resultierenden Faktor multipliziert.

KONTROLLE		Umrechnungsfaktor	7,12 DMBA			
$\bar{x}$ ± SE	Normalisiert		$\bar{x}$ ± SE	Normalisiert	Gesamtmittelwert	% der Kontr.
4332 ± 168		0,9234	1621 ± 189	1497 ± 175		
2725 ± 102	4000 ± 355	1,4679	1853 ± 84	2720 ± 123	2110 ± 290	53%
3676 ± 140		1,0881	1944 ± 103	2115 ± 112		

Auffallend ist, daß eine weitere Steigerung der Cancerogendosis nicht zu einer weiteren Reduktion der CFU-S/Femur führt (Tab. 4b).

Mit 58% der Kontrolle wurde ein gewisses Plateau erreicht (siehe auch Abbildung 4).

Tabelle 4b: CFU-S/Femur drei Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion i.p. Die Werte der Kontrollgruppe wurden auf $\bar{x}$ = 4000 ± 355 CFU-S/Femur normalisiert und die entsprechenden Werte der Verumgruppe mit dem resultierenden Faktor multipliziert.

KONTROLLE		Umrechnungsfaktor	7,12 DMBA			
$\bar{x}$ ± S	Normalisiert		$\bar{x}$ ± S	Normalisiert	Gesamt - mittelwert	% der Kontr.
3212 ± 166		1,2453	2532 ± 134	3153 ± 167		
3530 ± 114	4000 ± 355	1,1331	1695 ± 79	1920 ± 90	2320 ± 340	58%
6384 ± 176		0,6266	2988 ± 109	1872 ± 68		

* siehe Seite 37

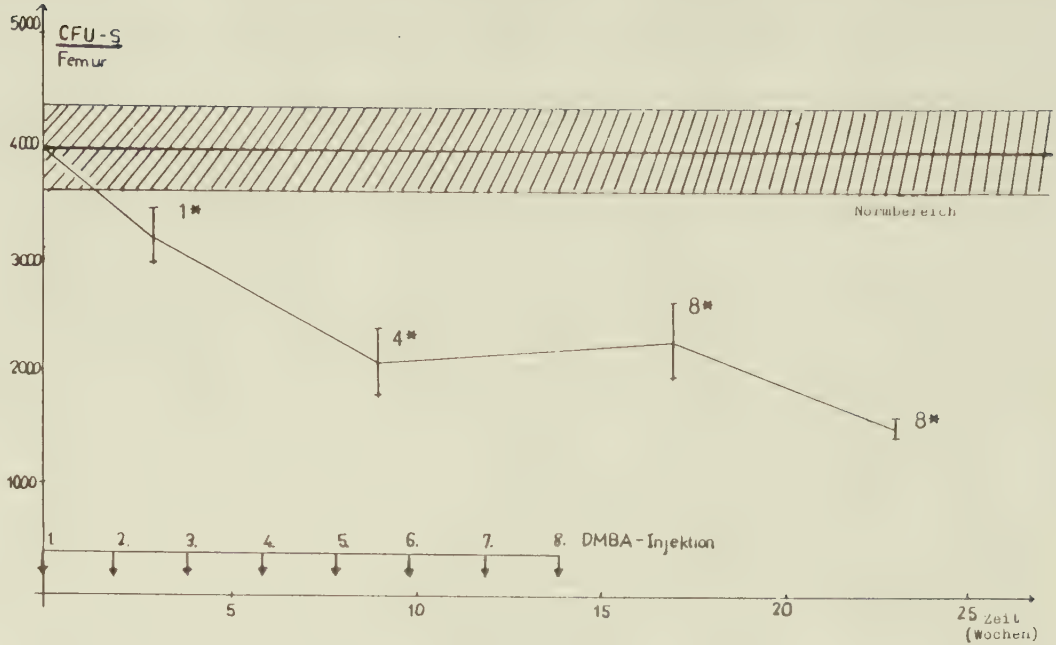


Abb. 4: Entwicklung der CFU-S-Zahl/Femur im Verlauf von 8 intraperitonealen DMBA-Injektionen (1 mg in jeweils 14-tägigem Abstand)

* Anzahl der DMBA-Injektionen

Während neun Wochen nach der achten Applikation das Knochenmark eine leichte Hyperplasie aufwies (Tab. 2b), fiel die CFU-S-Zahl/Femur gleichzeitig noch unter den Wert von 58%.

Dieser Rückgang auf 38% der Kontrolle (Tab. 4c) steht somit im diametralen Gegensatz zur Entwicklung der Gesamtpopulation im Knochenmark. Es ist möglich, daß zu diesem Zeitpunkt partiell geschädigte Stammzellen, die noch drei Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion zur Bildung von Milzkolonien befähigt waren, sechs Wochen später aufgrund eines Selektionsprozesses nicht mehr vorhanden waren und der Nachschub neuer Stammzellen durch die chronische Schädigung insuffizient wurde.

Tabelle 4c: CFU-S/Femur neun Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion intraperitoneal. Die Werte der Kontrollgruppe wurden auf $\bar{x} = 4000 \pm 355$ CFU-S/Femur normalisiert und die entsprechenden Werte der Verumgruppe mit dem resultierenden Faktor multipliziert.

KONTROLLE		Umrechnungsfaktor	7,12 DMBA		
$\bar{x} \pm$ SE	Normalisiert		$\bar{x} \pm$ SE	Normalisiert	% der Kontr.
5659 ± 141	4000 ± 355	0,7068	2127 ± 69	1503 ± 49	38%

3.7. Qualitätstest und Proliferationsfaktor (PF)

3.7.1. ^{125}IUDR-Inkorporation und PF 3, 9 und 15 Wochen nach einer einmaligen DMBA-Applikation

In Tabelle 5a werden die inkorporierten Radioaktivitäten der Empfängermilzen am dritten Tag nach der Transfusion für drei verschiedene Spendergruppen gegenübergestellt: 3, 9 und 15 Wochen nach einer einmaligen intraperitonealen 7,12 DMBA-injektion von 1 mg. In Tabelle 5b sind die entsprechenden Werte des fünften Tages für die drei Spendergruppen aufgeführt.

Tabelle 5a und b: Drei, neun und fünfzehn Wochen nach einmaliger 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Inkorporierte Radioaktivität der Empfängermilzen drei (Tab. 5a) und fünf (Tab. 5b) Tage nach Transfusion von 1,0, 1,5 und 2,25x1 Mill. Spenderknochenmarkzellen in letal bestrahlte Recipienten. Die verschiedenen Transfusionsmengen (1,0 - 2,25x1 Mill.) und die dazugehörigen Radioaktivitäten wurden auf 1,0x1 Mill. transfundierte Zellen bezogen und als Mittelwerte ± SE dargestellt. Einzelwerte für 3 Wochen nach 1x DMBA siehe im Anhang Tab. 14a - c.

Tabelle 5a:

5 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)				Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)				
Zeit nach einer DMBA-Inj.	Kontrolle $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	7,12 DMBA $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	% der Kontr.
3 Wochen	1314 ± 36	1380 ± 41	1866 ± 97	1520 ± 101	1143 ± 31	1195 ± 64	1151 ± 53	1163 ± 9	77%
9 Wochen	1290 ± 46	841 ± 55	1531 ± 28	1220 ± 117	1137 ± 31	1179 ± 38	1135 ± 34	1150 ± 8	94%
15 Wochen	1453 ± 45	1380 ± 29	1102 ± 29	1312 ± 62	1706 ± 59	1617 ± 106	1280 ± 63	1534 ± 75	117%

Tabelle 5b:

5 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)				Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)				
Zeit nach einer DMBA-Inj.	Kontrolle $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	7,12 DMBA $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2{,}25 \cdot 10^6$	$\bar{x} \pm$ SE	% der Kontr.
3 Wochen	37869 ± 1010	39288 ± 1532	30096 ± 894	35758 ± 1651	28793 ± 1136	22453 ± 667	22910 ± 489	24719 ± 1178	69%
9 Wochen	19550 ± 1876	28646 ± 1961	26595 ± 1401	24930 ± 1591	30943 ± 1971	23915 ± 1117	19812 ± 1061	24890 ± 1870	100%
15 Wochen	44138 ± 1033	34956 ± 827	32113 ± 921	37069 ± 2095	39534 ± 1513	41415 ± 2005	30598 ± 1412	37182 ± 1927	100%

Tabelle 5c: Drei, neun und fünfzehn Wochen nach einmaliger 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Der Quotient aus der inkorporierten Radioaktivität am 5. Tag und der des 3. Tages ergibt jeweils für jede der drei Zellkonzentrationen den Proliferationsfaktor. Die Werte der Kontrollgruppen wurden auf den PF $\bar{x}$ = 24,48 normalisiert und die entsprechenden Werte der Verumgruppen mit dem resultierenden Faktor multipliziert. PF = Proliferationsfaktor

Zeit nach einer einmaligen 7,12 DMBA-Injektion	K O N T R O L L E				Umrechnungsfaktor	7,12 D M B A				
	PF	$\bar{x} \pm$ SE PF	PF (normalisiert)	$\bar{x} \pm$ SE PF (normalisiert)		PF	$\bar{x} \pm$ SE PF	PF (normalisiert)	$\bar{x} \pm$ SE PF (normalisiert)	% der Kontr.
3 Wochen	28,83		28,83			25,19		25,19		
	28,47	24,48 ±	28,47	24,48 ±	1,0000	18,79	21,29 ±	18,79	21,29 ±	87%
	16,13	3,41	16,13	3,41		19,90	1,61	19,90	1,61	
9 Wochen	15,16		16,72			27,21		30,00		
	34,08	22,20 ±	37,58	24,48 ±	1,1027	20,28	21,65 ±	22,36	23,87 ±	98%
	17,37	3,45	19,15	3,80		17,45	1,67	19,24	1,84	
15 Wochen	30,37		26,29			23,17		20,06		
	25,33	28,28 ±	21,93	24,48 ±	0,8656	25,62	24,23 ±	22,18	20,97 ±	86%
	29,13	0,88	25,22	0,76		23,91	0,42	20,70	0,36	

An beiden Tagen war drei Wochen nach der einmaligen 7,12 DMBA-Applikation ein Rückgang auf 77% beziehungsweise 69% der Kontrolle festzustellen.

Schon neun Wochen nach der Cancerogengabe erreichten die inkorporierten Radioaktivitäten wieder das Niveau der Kontrollgruppe.

Dies blieb auch 15 Wochen nach der DMBA-Injektion der Fall.

Werden die inkorporierten Radioaktivitäten des fünften Tages durch die entsprechenden Werte des dritten Tages dividiert, erhält man den dazugehörigen Proliferationsfaktor. Beispiele für die Ergebnisse einzelner Qualitätsteste drei, neun und fünfzehn Wochen nach einer einmaligen Cancerogengabe zeigen die Abbildungen 5 - 7. Die Werte in Tabelle 5c zeigen eine leichte Reduktion für die 3-Wochen-Gruppe, einen Anstieg für die 9-Wochen-Gruppe und mit 86% der Kontrolle wieder einen leichten Rückgang für die 15-Wochen-Gruppe. Eine ähnliche Entwicklung konnte auch bei den CFU-S/Femur (Tab. 3) nach einer einmaligen DMBA-Applikation verzeichnet werden.

Nach einer akuten Schädigung der proliferierenden Zellen im Knochenmark durch das Cancerogen (3 Wochen) setzt eine reaktive Proliferationssteigerung ein (9 Wochen), die - möglicherweise durch einen negativen feed-back-Mechanismus - fünfzehn Wochen nach der 7,12 DMBA-Injektion wieder auf Normalwerte bezüglich der Proliferationsaktivität zurückgeführt wird. Einschränkend muß gesagt werden, daß bei sämtlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum- und Kontrollgruppe im Sinne des Wilcoxon-Mann-Whitney-Testes bestanden.

In den Tabellen 14a - 14c im Anhang sind die eben besprochenen Parameter für die 3-Wochen-Gruppe noch einmal im einzelnen aufgeführt.

3.7.2. ^{125}IUdR-Inkorporation und PF 3 Wochen nach viermaliger 7,12 DMBA-Applikation

Bei einer chronischen Schädigung des Knochenmarks wie zum Beispiel nach einer viermaligen Gabe von 7,12 DMBA (1 mg) in

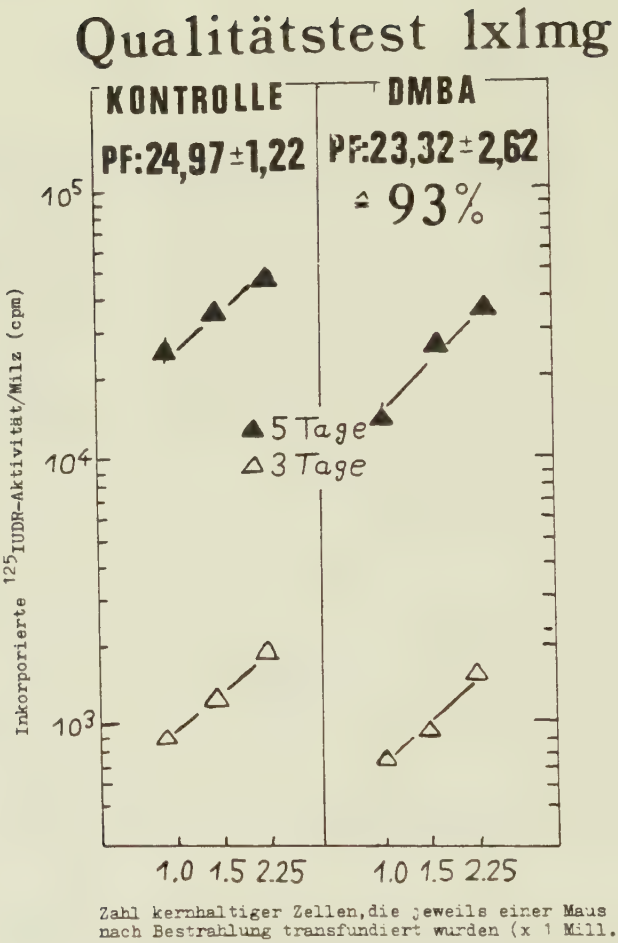


Abb. 5: 3 Wochen nach einer intraperitonealen 7,12 DMBA-Injektion von 1 mg

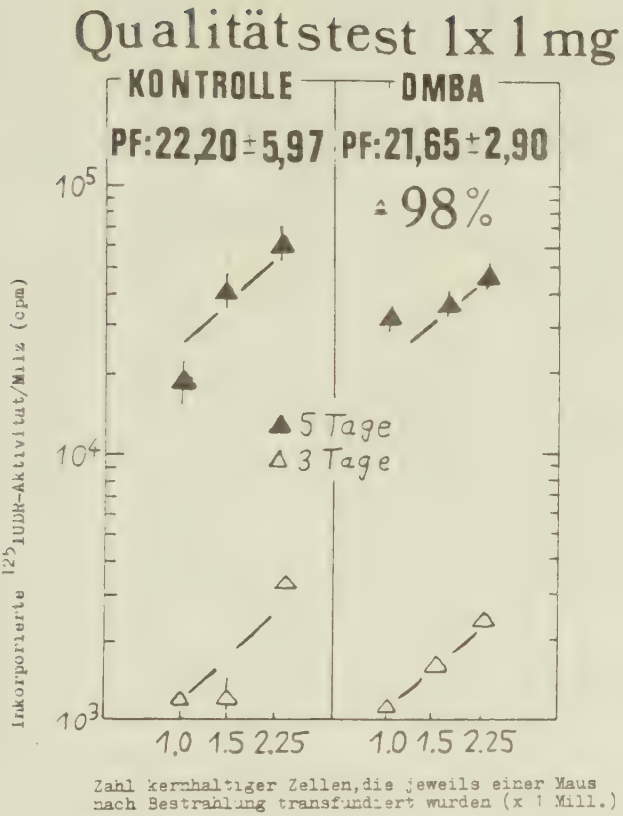


Abb. 6: 9 Wochen nach einer intraperitonealen 7,12 DMBA-Injektion von 1 mg

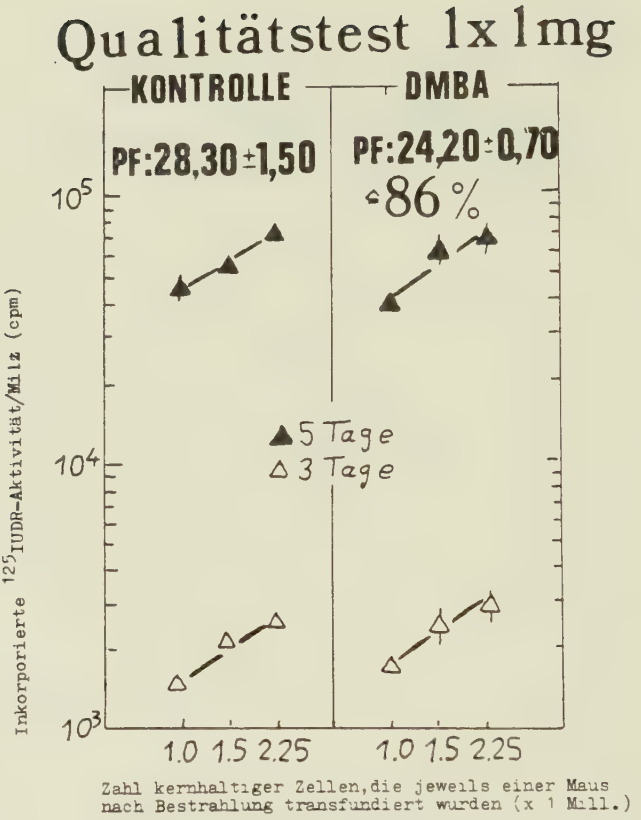


Abb. 7: 15 Wochen nach einer intraperitonealen 7,12 DMBA-Injektion von 1 mg

Tab. 6a und b: Drei Wochen nach der vierten 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Inkorporierte Radioaktivität der Empfängermilzen drei (Tab. 6a) fünf (Tab. 6b) Tage nach Transfusion von 1,0, 1,5 und 2,25x1 Mill. Spenderknochenmarkszellen in letal bestrahlte Recipienten. Die verschiedenen Transfusionsmengen (1,0 - 2,25x1 Mill.) und die dazugehörigen Radioaktivitäten wurden auf 1,0x1 Mill. transfundierte Zellen bezogen und als Mittelwerte ± SE dargestellt.

Tabelle 6a:

3 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					
Kontrolle $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	Gesamt – mittel – wert	7,12 DMBA $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	Gesamt – mittel – wert	% der Kontr.
1370 ± 44	896 ± 36	1221 ± 64	1162 ± 68		1130 ± 32	1140 ± 82	961 ± 47	1081 ± 76		
1158 ± 76	797 ± 33	1120 ± 54	1025 ± 77	997 ± 87	1040 ± 70	885 ± 38	638 ± 13	854 ± 23	1066 ± 98	107%
864 ± 16	795 ± 17	951 ± 28	803 ± 29		1296 ± 38	1362 ± 63	1127 ± 44	1262 ± 69		

Tabelle 6b:

5 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					
Kontrolle $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	Gesamt – mittel – wert	7,12 DMBA $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	Gesamt – mittel – wert	% der Kontr.
21723 ± 1056	23994 ± 893	22176 ± 761	22631 ± 401		21254 ± 2011	17625 ± 976	17802 ± 967	18893 ± 682		
17755 ± 1320	17205 ± 2918	17833 ± 1397	17598 ± 114	17707 ± 2296	13219 ± 1887	12421 ± 516	11284 ± 460	12308 ± 324	14626 ± 1744	83%
11280 ± 564	13742 ± 601	13653 ± 403	12892 ± 465		11940 ± 440	14078 ± 361	12011 ± 264	12676 ± 405		

Tabelle 6c: Drei Wochen nach der vierten 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Der Quotient aus der inkorporierten Radioaktivität am 5. Tag und der des 3. Tages, ergibt jeweils für jede der drei verschiedenen Zellkonzentrationen den Proliferationsfaktor. Die Werte der Kontrollgruppen wurden auf den Proliferationsfaktor $\bar{x}$ = 17,61 normalisiert und die entsprechenden Werte der Verumgruppen mit dem resultierenden Faktor multipliziert.

KONTROLLE				Umrechnungsfaktor	7,12 DMBA				
PF	$\bar{x} \pm$ SE PF	PF (normalisiert)	$\bar{x} \pm$ SE PF (normalisiert)		PF	$\bar{x} \pm$ SE PF	PF (normalisiert)	$\bar{x} \pm$ SE PF (normalisiert)	% der Kontr.
15,86		13,79			15,83		13,76		
18,16	20,26 ±	15,78	17,61 ±	0,8692	18,53	17,69 ±	16,11	15,38 ±	87%
26,77	1,92	23,27	1,67		18,71	0,62	16,26	0,54	
15,33		15,33			12,71		12,71		
15,92	17,61 ±	15,92	17,61 ±	1,0000	14,04	14,81 ±	14,04	14,81 ±	84%
21,58	1,15	21,58	1,15		17,69	0,86	17,69	0,86	
14,36		15,60			9,21		10,01		
16,99	16,21 ±	18,46	17,61 ±	1,0864	10,34	10,07 ±	11,23	10,94 ±	62%
17,29	0,54	18,78	0,58		10,66	0,25	11,58	0,28	

14-tägigen Intervallen (Qualitätstest drei Wochen nach der letzten Injektion) sind die Veränderungen der Proliferationsaktivitäten deutlicher. Zwar waren die inkorporierten Radioaktivitäten der Spendermilzen drei Tage (Tabelle 6a) beziehungsweise fünf Tage (Tabelle 6b) mit 107% und 83% jeweils der Kontrolle nur leicht verändert, doch zeigen die entsprechenden Proliferationsfaktoren in Tabelle 6c eine eindeutige Tendenz zur Reduktion.

Ein Beispiel für ein Ergebnis eines Qualitätstestes drei Wochen nach der vierten 7,12 DMBA-Injektion zeigt Abbildung 9.

Die Werte der einzelnen Proliferationsfaktoren lagen mit 62% - 87% der Kontrolle (Mittelwert 78,7%, Tab. 6d, Abb. 8) unter denen der 1x1 mg-Gruppe, die drei Wochen nach der DMBA-Injektion mit 87,4% der Kontrolle (Tab. 6d) nur eine leichte Reduktion aufwies.

Tabelle 6d: Gesamtmittelwerte der Proliferationsfaktoren drei Wochen nach einer, vier und acht DMBA-Injektionen

Anzahl der DMBA-Inj.	Gesamtmittelwerte der einzelnen Proliferationsfaktoren			Anzahl d. Versuche
	Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontr.	
1	25,69 ± 1,40	22,45 ± 0,89	87,4%	4
4	18,03 ± 0,75	14,19 ± 0,71	78,7%*	3
8	19,39 ± 0,65	15,00 ± 0,85	77,3**	3

* $p < 0,05$,

** $p < 0,02$, siehe Anhang

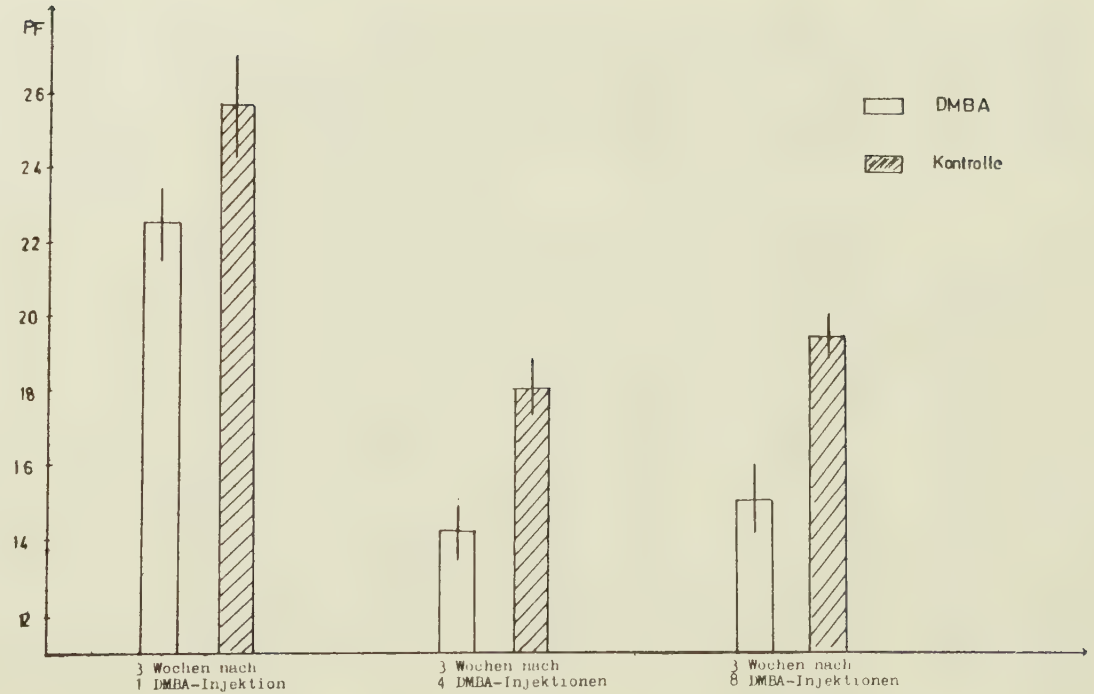


Abb. 8: Proliferationsfaktor (PF) nach verschiedener Anzahl von DMBA-Injektionen (jeweils in 14-tägigem Abstand 1 mg). Drei Wochen nach jeweils letzter intraperitonealer Injektion

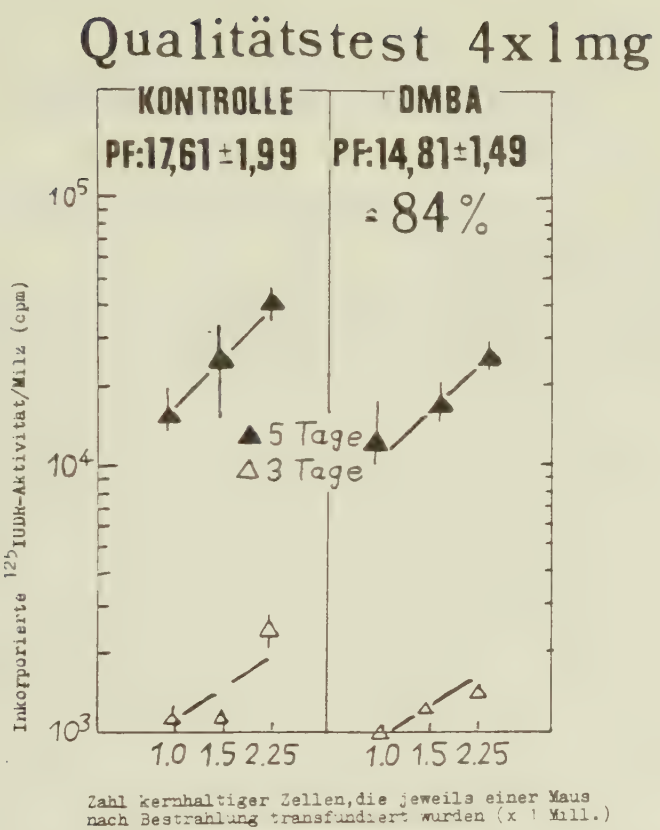


Abb. 9: 3 Wochen nach der vierten intraperitonealen 7,12 DMBA-Injektion von 1 mg. Intervall zwischen einzelnen Injektionen 2 Wochen

Die Unterschiede zwischen Verum- und Kontrollgruppe waren bei der 4x1 mg-Gruppe mit 5% Irrtumswahrscheinlichkeit nach dem Wilcoxon-Test signifikant (siehe Anhang Seite 105).

Auffallend ist, daß zum selben Zeitpunkt die CFU-S/Femur mit 53% der Kontrolle (Tab. 4a) einen ungleich schwereren Rückgang zeigten.

3.7.3. ^{125}IUDR-Inkorporation und PF 3 Wochen nach achtmaliger 7,12 DMBA-Applikation

Wird die 7,12 DMBA-Dosis auf insgesamt 8 mg erhöht, sind auch bei den inkorporierten Radioaktivitäten (Tabelle 7a und b) nach dreiwöchiger Erholungszeit eindeutige Reduktionen zu erkennen.

Drei Tage nach der Transfusion der durch 8 mg DMBA-geschädigten Spenderknochenmarkszellen fielen die Werte auf 75% der Kontrolle zurück. Fünf Tage nach der Transfusion war sogar ein Rückgang auf 60% der Kontrolle zu verzeichnen.

Die resultierenden Proliferationsfaktoren (Tabelle 7c) entsprechen ungefähr den Werten der 4x1 mg-Gruppe. Doch liegt der Mittelwert mit 77,4% der Kontrolle (Tabelle 6d, Abbildung 8) leicht unter den 78,7% der 4x1 mg-Gruppe.

Ein Beispiel für ein Ergebnis eines Qualitätstestes drei Wochen nach der achten DMBA-Injektion zeigt die Abbildung 10.

Die Unterschiede zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe waren bei der 8x1 mg-Gruppe mit 2% Irrtumswahrscheinlichkeit nach dem Wilcoxon-Test signifikant (siehe Anhang S. 106).

Auch nach der Dosis von insgesamt 8 mg besteht wie schon nach 4 mg eine Diskrepanz zwischen den CFU-S/Femur (58% der Kontrolle, Tabelle 4b) einerseits und dem Proliferationsfaktor von 77,4% (Tabelle 6d) andererseits.

Tabelle 7a und 7b: Drei Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Inkorporierte Radioaktivität der Empfängermilzen drei (Tab. 7a) und fünf (Tab.7b) Tage nach Transfusion von 1,0, 1,5 und 2,25x1 Mill. Spender-Knochenmarkszellen in letal bestrahlte Recipienten. Die verschiedenen Transfusionsmengen (1,0 - 2,25x1 Mill.) und die dazugehörigen Radioaktivitäten wurden auf 1,0x1 Mill. transfundierte Zellen bezogen und als Mittelwerte ± SE dargestellt.

Tabelle 7a:

3 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					
Kontrolle $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	Gesamt – mittel – wert	7,12 DMBA $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	Gesamt – mittel – wert	% der Kontr.
926 ± 28	833 ± 21	771 ± 19	843 ± 32	1232 ± 36	998 ± 27	847 ± 18	764 ± 23	870 ± 32	921 ± 136	75%
1257 ± 46	1166 ± 13	943 ± 48	1122 ± 50		815 ± 29	608 ± 18	560 ± 22	661 ± 33		
1980 ± 66	1653 ± 41	1564 ± 33	1732 ± 66		1464 ± 49	1211 ± 57	1022 ± 28	1232 ± 63		

Tabelle 7b:

5 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					
Kontrolle $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	Gesamt – mittel – wert	7,12 DMBA $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x} \pm$ SE	Gesamt – mittel – wert	% der Kontr.
22268 ± 508	16294 ± 803	15439 ± 1015	18000 ± 1240	23345 ± 2616	17400 ± 321	14759 ± 537	11304 ± 604	14488 ± 1019	13890 ± 2088	60%
27331 ± 1113	22367 ± 568	19172 ± 913	22957 ± 1356		7144 ± 190	7573 ± 294	12860 ± 308	9192 ± 374		
39199 ± 516	24390 ± 785	23642 ± 1633	29077 ± 2925		18388 ± 414	17927 ± 964	17650 ± 733	17988 ± 124		

Tabelle 7c: Drei Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Der Quotient aus der inkorporierten Radioaktivität am 5. Tag und der des 3. Tages, ergibt jeweils für jede der drei verschiedenen Zellkonzentrationen den Proliferationsfaktor. Die Werte der Kontrollgruppen wurden auf den Proliferationsfaktor $\bar{x} = 21,21$ normalisiert und die entsprechenden Werte der Verumgruppen mit dem resultierenden Faktor multipliziert.

KONTROLLE				Umrechnungsfaktor	7,12 DMBA				
PF	$\bar{x} \pm SE$ PF	PF (normalisiert)	$\bar{x} \pm SE$ PF (normalisiert)		PF	$\bar{x} \pm SE$ PF	PF (normalisiert)	$\bar{x} \pm SE$ PF (normalisiert)	% der Kontr.
19,55		19,55			14,80		14,80		
20,02	21,21 ±	20,02	21,21 ±	1,0000	17,42	16,55 ±	17,42	16,55 ±	78%
24,05	0,83	24,05	0,83		17,43	0,51	17,43	0,51	
19,18		19,92			8,77		9,11		
20,33	20,42 ±	21,12	21,21 ±	1,0387	9,02	13,58 ±	9,37	14,11 ±	67%
21,74	0,43	22,58	0,44		22,96	2,71	23,85	2,81	
14,76		18,90			12,56		16,09		
15,12	16,56 ±	19,37	21,21 ±	1,2808	14,80	14,88 ±	18,96	19,06 ±	90%
19,80	0,94	25,86	1,20		17,27	0,79	22,12	1,01	

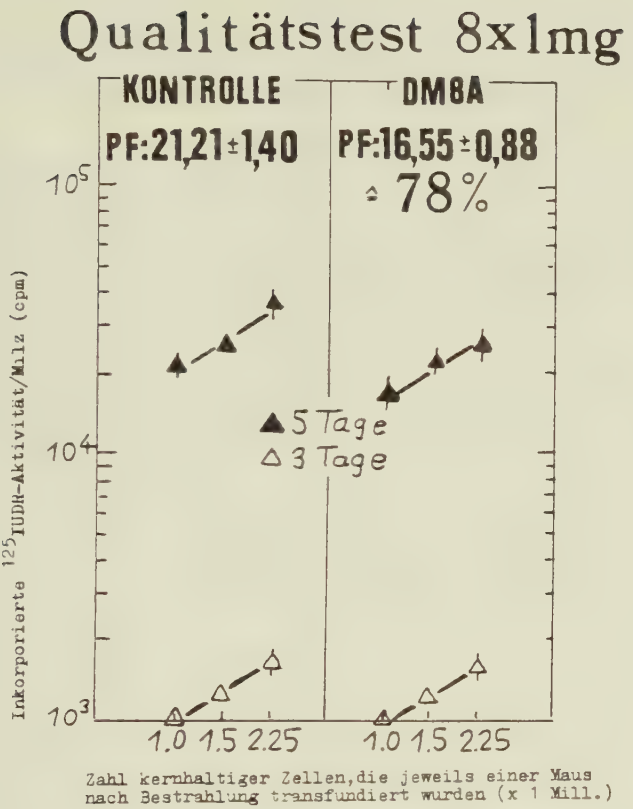


Abb. 10: 3 Wochen nach der achten intraperitonealen 7,12 DMBA-Injektion von 1 mg. Intervall zwischen einzelnen Injektionen 2 Wochen

3.7.4. ^{125}IUDR-Inkorporation und PF 9 Wochen nach achtmaliger 7,12 DMBA-Applikation

Während nach einer 7,12 DMBA-Injektion einer Erholungszeit von neun Wochen ausreichte, um eine normale Proliferationsrate der Knochenmark-Stammzelle und ihrer Nachkommen wiederherzustellen (Proliferationsfaktor 98% der Kontrolle, Tabelle 5c), war dies nach acht DMBA-Applikationen nicht mehr der Fall.

Neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion fiel die inkorporierte Radioaktivität auf 79% und 58% der Kontrolle am dritten beziehungsweise fünften Tag ab (Tabelle 8b und c), so daß der resultierende Proliferationsfaktor mit 75% der Kontrolle (Tabelle 8a, Abbildung 11) in dem Bereich verblieb, der schon drei Wochen nach der achten DMBA-Injektion erreicht worden war. Gleichzeitig waren aber die CFU-S/Femur mit 38% der Kontrolle (Tabelle 4c) gegenüber den 58% der Kontrolle (Tabelle 4b), die drei Wochen nach der achten DMBA-Applikation zu finden waren, weiter reduziert.

Tabelle 8a: Proliferationsfaktoren neun Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion
Werte aus einem Versuch

Kontrolle		7,12 DMBA		
PF	$\bar{x} \pm$ SE PF	PF	$\bar{x} \pm$ SE PF	% der Kontr.
26,64		16,96		
19,91	20,53 ±	17,33	15,45 ±	75%
15,03	1,95	12,07	0,98	

Tabelle 8b und c: Neun Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Inkorporierte Radioaktivität der Empfängermilzen drei (Tab. 8b) und fünf (Tab. 8c) Tage nach Transfusion von 1,0, 1,5 und 2,25x1 Mill. Spenderknochenmarkszellen in letal bestrahlte Recipienten. Die verschiedenen Transfusionsmengen (1,0 - 2,25x1 Mill.) und die dazugehörigen Radioaktivitäten wurden auf 1,0x1 Mill. transfundierte Zellen bezogen und als Mittelwerte ± SE dargestellt.

Tabelle 8b:

3 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)								
Kontrolle $1,0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1,5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2,25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x}$ ± SE	7,12 DMBA $1,0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1,5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2,25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x}$ ± SE	% der Kontr.
1316 ± 37	1225 ± 51	1190 ± 75	1244 ± 31	912 ± 38	929 ± 17	1116 ± 86	986 ± 53	79%

Tabelle 8c:

5 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)								
Kontrolle $1,0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1,5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2,25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x}$ ± S	7,12 DMBA $1,0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1,5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2,25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x}$ ± SE	% der Kontr.
35060 ± 1029	24397 ± 1669	17881 ± 896	27779 ± 4088	15469 ± 580	16096 ± 639	13472 ± 627	15012 ± 646	58%

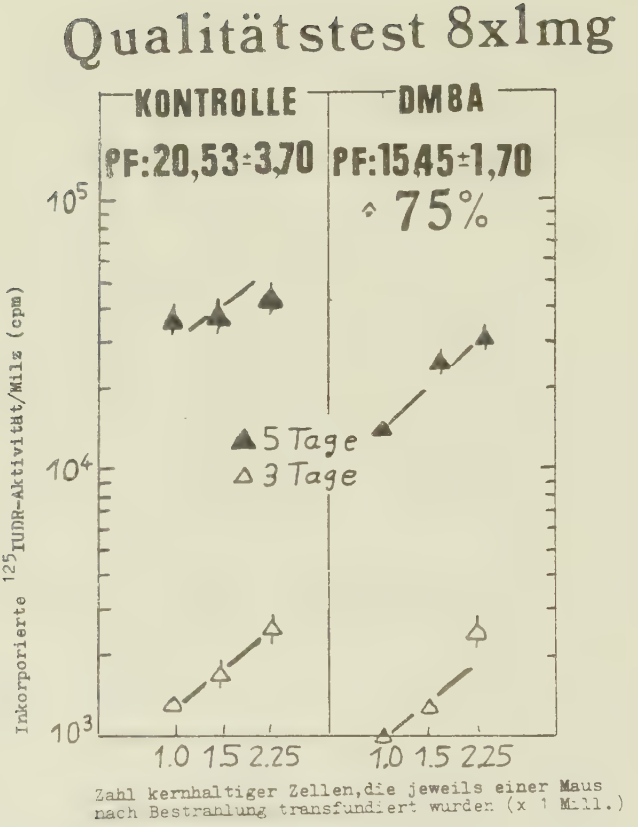


Abb. 11: 9 Wochen nach der achten intraperitonealen 7,12 DMBA-Injektion von 1 mg. Intervall zwischen einzelnen Injektionen 2 Wochen

3.7.5. Entwicklung des PF und der Verdopplungszeit proliferierender Zellen 3 und 9 Wochen nach ein- und mehrmaliger 7,12 DMBA-Applikation

Tabelle 9 und die Abbildungen 8 und 12 zeigen noch einmal die Entwicklung des Proliferationsfaktors im Verlaufe von acht 7,12 DMBA-Injektionen in einem zusammenfassenden Überblick.

Die durchschnittliche Verdopplungszeit (Berechnung siehe Tabelle 9) der proliferierenden Zellen im Knochenmark war drei Wochen nach einer einmaligen Cancerogengabe 0,41 h = 25 Minuten länger als bei den entsprechenden Zellen der Kontrollgruppe (Tab. 9). Diese Differenz wurde mit steigender Dosis immer größer und betrug drei Wochen nach der achten Cancerogenapplikation schon 0,97 h = 58 Minuten. Bemerkenswert ist, daß neun Wochen nach der achten Dosis die durchschnittliche Verdopplungszeit sich noch um 0,17 h = 10 Minuten verlängerte, so daß die Differenz zur Kontrollgruppe insgesamt 1,14 h = 68 Minuten betrug.

Nach Frindel et al. (39) ist die Generationszeit normaler Knochenmarkszellen von C3H-Mäusen ungefähr 8,5 Stunden, wobei im einzelnen auf die G_2-Phase 15 Minuten, die S-Phase 4,5 Stunden, die G_1-Phase 3 Stunden und die Mitosephase 10 Minuten entfallen (Mindestzeiten). Die Verdopplungszeit proliferierender Zellen umfaßt den Zellverlust (Zelltod, Ausreifung mitotisch aktiver Zellen) und ist daher gegenüber der Generationszeit entsprechend verlängert (siehe Diskussion).

3.8. Beziehung zwischen den CFU-S/Femur und dem Proliferationsfaktor

Nach der mehrmaligen Applikation des Cancerogens zeigen die beiden Parameter - CFU-S/Femur und Proliferationsfaktor - eine divergierende Entwicklung: So findet man die CFU-S/Femur früher und viel stärker reduziert, als dies beim Proliferationsfaktor der Fall war.

Tabelle 9: Entwicklung des Proliferationsfaktors unter acht 7,12 DMBA-Injektionen. Die Werte der 7,12 DMBA-Gruppen wurden zum Normbereich von $\bar{x} = 20,76 \pm 1,21$ in Beziehung gesetzt. Zusätzlich wurden die entsprechenden Verdopplungszeiten der proliferierenden Zellen angegeben. Dabei ist

$$t_d = 48h \cdot \ln 2 / \ln PF$$

	Kontrolle			Umrechnungsfaktor	7,12 DMBA			
	$\bar{x} \pm SE$ PF	$\bar{x} \pm SE$ PF (normalisiert)	Verdopplungszeit t_d		$\bar{x} \pm SE$ PF	$\bar{x} \pm SE$ PF (normalisiert)	Gesamtmittelwert	Verdopplungszeit t_d
3 Wochen nach einer 7,12 DMBA Injektion von 1 mg	23,48 ± 1,37	20,76 ± 1,21	10,97h ± 0,22h	0,9842	25,14 ± 4,66 17,01 ± 0,94 19,33 ± 0,54 21,93 ± 1,42	22,23 ± 4,12 15,04 ± 0,83 17,62 ± 0,48 19,39 ± 1,26	18,57 ± 1,31	11,36h ± 0,36h
3 Wochen nach der vierten 7,12 DMBA-Inj. von 1 mg	17,61 ± 1,19	20,76 ± 1,21	10,97h ± 0,22h	1,1789	15,38 ± 0,54 14,81 ± 0,86 10,94 ± 0,28	18,13 ± 0,64 17,45 ± 1,01 12,89 ± 0,33	16,16 ± 1,35	11,95h ± 0,37h
3 Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Inj. von 1 mg	21,21 ± 1,43	20,76 ± 1,21	10,97h ± 0,22h	0,9788	16,55 ± 0,51 14,11 ± 2,71 19,06 ± 0,79	16,20 ± 0,50 13,81 ± 2,65 18,66 ± 0,77	16,22 ± 1,14	11,94h ± 0,31h
9 Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Inj. von 1 mg	20,53 ± 1,20	20,76 ± 1,21	10,97h ± 0,22h	1,0112	15,45 ± 0,98	15,62 ± 0,99	15,62 ± 0,99	12,11h ± 0,49h

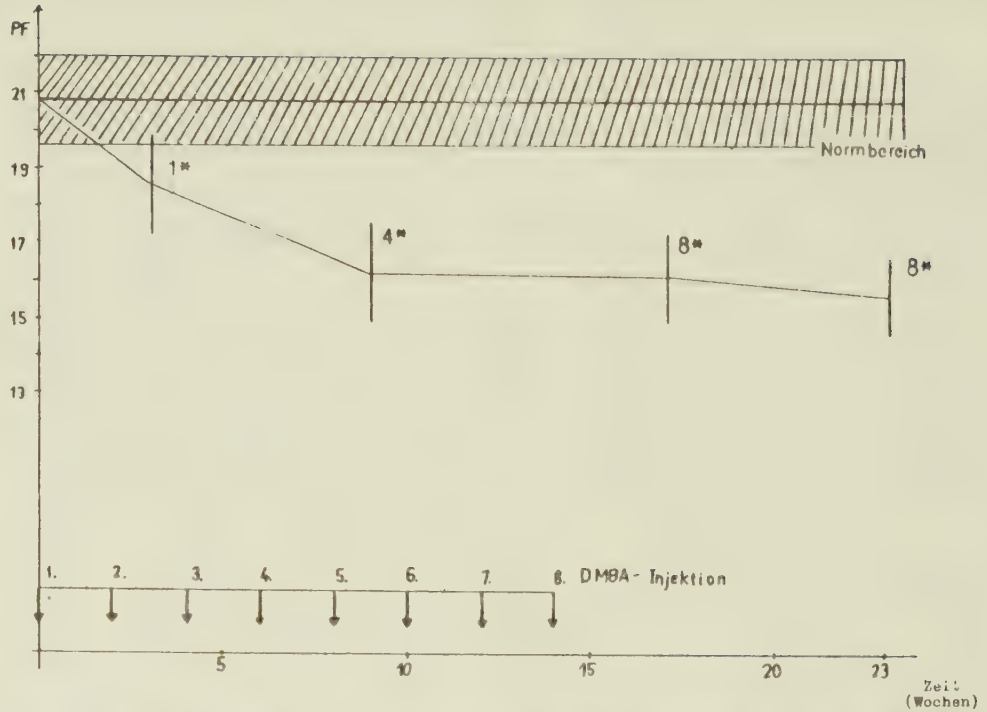


Abb. 12: Entwicklung des Proliferationsfaktors (PF) im Verlauf von acht intraperitonealen DMBA-Injektionen (1 mg in jeweils 14-tägigem Abstand)

* Anzahl der DMBA-Injektionen

Um beide Größen miteinander in Relation setzen zu können, wurden sowohl die CFU-S als auch die inkorporierten Radioaktivitäten der Empfängermilzen auf 1.10^6 transfundierte Spenderknochenmarkszellen bezogen. Wird die inkorporierte Radioaktivität/1.10^6 transfundierte Zellen durch die dazugehörigen CFU-S/1.10^6 transfundierte Zellen dividiert, so erhält man den "Proliferationsindex". Dieser Index bleibt konstant, wenn die Veränderung der CFU-S parallele und gleichwertige Änderungen der inkorporierten Radioaktivität, die neben der proliferierenden Stammzelle auch die sich teilende und differenzierende Nachkommenschaft miterfaßt, zur Folge haben. Der Proliferationsindex der Verumgruppe wurde in allen Fällen als Prozent der Kontrolle ausgedrückt. Fällt die CFU-S-Anzahl der Verumgruppe bei relativ konstant bleibender inkorporierter Radioaktivität, so vergrößert sich der Proliferationsindex und erreicht dabei einen Wert über 100% der Kontrolle.

Tabelle 15a (Anhang) und Abbildung 13 zeigen die Entwicklung des durchschnittlichen Proliferationsindexes im Verlauf von insgesamt fünfzehn Wochen nach einer einmaligen DMBA-Injektion von 1 mg drei Tage nach der Transfusion der Spenderknochenmarkszellen. Dabei stiegen die Werte sowohl für den dritten Tag (Tab. 15a, Anhang und Abb. 13) als auch für den fünften Tag (Tab. 15b, Anhang und Abbildung 14) kontinuierlich an. Die relativ geringen Differenzen zur Kontrolle lassen aber keine eindeutige Aussage zu.

Zur Verdeutlichung der Proliferationsindex-Veränderungen sind in den Tabellen 10 - 12 und den Abbildungen 13 - 16 die Werte modifiziert angegeben: Von den Werten der Verumgruppen, die als % der Kontrolle berechnet worden sind (Tabellen 15 - 18, Anhang), wurden jeweils 100% (= Kontrollwert) subtrahiert. Die Abszisse in den Abbildungen 13 - 16 stellt also das Kontrollniveau dar. Diese Differenzgröße (Δ%) ist zum Beispiel negativ, wenn der Proliferationsindex in der Verumgruppe kleiner ist als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 10a: Proliferationsindex drei, neun und fünfzehn Wochen nach einer 7,12 DMBA-Injektion (drei Tage nach der Transfusion)
Δ% = % d.K. - 100%

3 d	$\frac{cpm/1.10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/1.10^6\ tZ}$		
Zeit nach einer 7,12 - DMBA-Injekt.	Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle in Δ %
3 Wochen	9,9 ± 1,1	8,4 ± 1,0	- 15%
9 Wochen	11,3 ± 2,9	10,4 ± 0,4	- 8%
15 Wochen	9,9 ± 0,8	12,2 ± 1,9	+ 24%

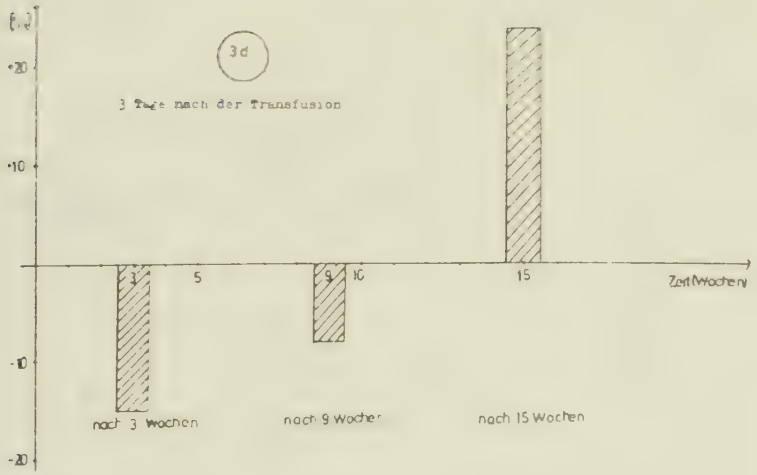


Abb. 13: $\frac{cpm/10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/10^6\ tZ}$ (in Differenz d. % der Kontrolle)

in verschiedenen Zeitabständen nach einer DMBA-Injektion von 1 mg

Tabelle 10b: Proliferationsindex drei, neun und fünfzehn Wochen nach einer DMBA-Injektion (fünf Tage nach der Transfusion)

5 d	$\frac{cpm/1.10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/1.10^6\ tZ}$		
Zeit nach einer 7,12-DMBA-Injekt.	Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle in Δ %
3 Wochen	214,2 ± 17,0	178,0 ± 12,0	- 17 %
9 Wochen	232,0 ± 36,0	224,0 ± 41,0	- 3 %
15 Wochen	280,0 ± 39,0	298,0 ± 38,0	+ 6 %

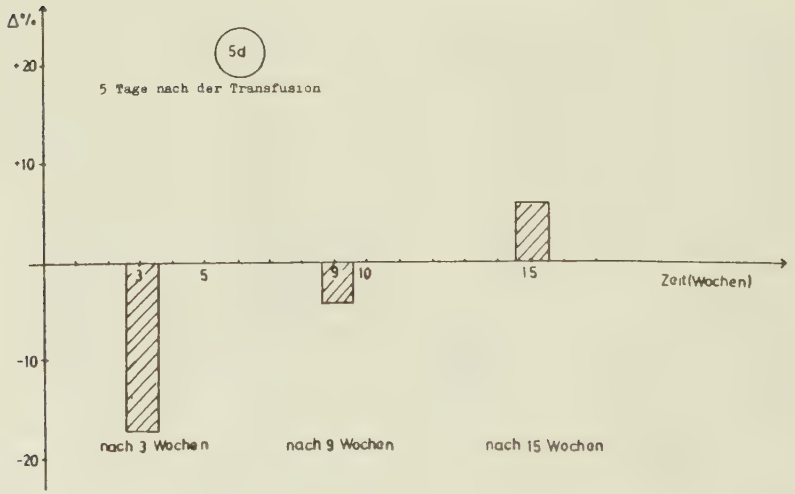


Abb. 14: $\frac{cpm/10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/10^6\ tZ}$ (in Differenz d. % der Kontrolle)

in verschiedenen Zeitabständen nach einer DMBA-Injektion von 1 mg

Drei Wochen nach der vierten 7,12 DMBA-Injektion steigen die durchschnittlichen Proliferationsindices am dritten und fünften Tag nach der Transfusion (Tabelle 16a,b im Anhang und Abbildungen 15, 16) auf sehr hohe Werte an.

Sie betrugen 247% beziehungsweise 191% der Kontrolle. Der Anstieg kommt vor allem durch einen überproportionalen Abfall der CFU-S (Tabelle 4a) bei gleichzeitig nur geringer Reduktion der inkorporierten Radioaktivität (Tabelle 6a und b) zustande.

In der Tabelle 11a sind die Proliferationsindices im Verlaufe von bis zu acht DMBA-Injektionen (jeweils drei Wochen nach der letzten Applikation und drei Tage nach der Transfusion) als Differenzgröße Δ% aufgeführt.

Tabelle 11a: Proliferationsindex drei Wochen nach einer, der vierten und der achten DMBA-Injektion (drei Tage nach der Transfusion)

3 d	$\frac{cpm/1.10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/1.10^6\ tZ}$		
Anzahl der 7,12 DMBA-Injektionen	Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle in Δ%
3 Wochen nach einer DMBA-Injekt.	9,9 ± 1,1	8,4 ± 1,0	- 15%
3 Wochen nach der vierten Injektion	6,4 ± 0,5	15,8 ± 1,2	+147%
3 Wochen nach der 8. DMBA-Injektion	7,1 ± 0,6	9,5 ± 0,6	+ 34%

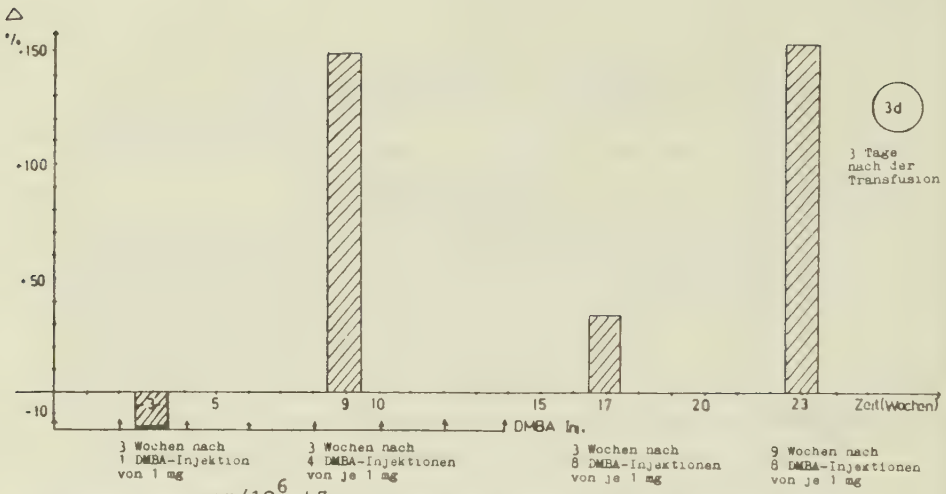


Abb. 15: $\frac{cpm/10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/10^6\ tZ}$ (in Differenz d.% der Kontrolle)

unter 1 - 4 - 8 DMBA-Injektionen nach jeweils 3(9) Wochen (3 Tage nach der Transfusion)

Wird die Cancerogendosis auf insgesamt 8 mg erhöht, so fallen drei Wochen nach der achten DMBA-Injektion die durchschnittlichen Proliferationsindices unter die Werte der 4 mg-Gruppe.

Sie betrugen 134% der Kontrolle am dritten und 103% der Kontrolle am fünften Tag nach der Transfusion (Tabelle 17a,b im Anhang und Abbildungen 15,16).

Der Rückgang der Proliferationsindices auf fast normale Werte wird hauptsächlich durch eine deutlichere Reduktion der inkorporierten Radioaktivität verursacht, während die CFU-S auf ihrem niedrigen Niveau konstant bleiben.

Die Tabelle 11b enthält die Proliferationsindices in der selben modifizierten Art wie in Tabelle 11a, nur für den fünften Tag nach der Transfusion.

Tabelle 11b: Proliferationsindex drei Wochen nach einer, der vierten und der achten DMBA-Injektion (fünf Tage nach der Transfusion)

5 d	$\frac{cpm/1.10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/1.10^6\ tZ}$		
Anzahl der 7,12 DMBA-Injektionen	Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle in Δ%
3 Wochen nach einer DMBA-Injektion	214,2 ± 17,0	178,0 ± 12,0	- 17%
3 Wochen nach der vierten DMBA-Injekt.	111,6 ± 8,7	213,3 ± 11,3	+ 91%
3 Wochen nach der achten DMBA-Injekt.	138,3 ± 10,3	142,2 ± 5,7	+ 3%

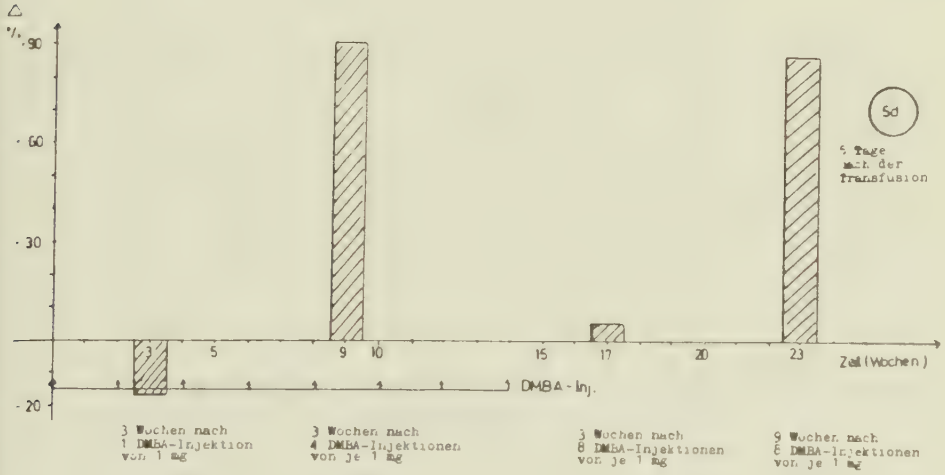


Abb. 16: $\frac{cpm/10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/10^6\ tZ}$ (in Differenz d.% der Kontrolle) unter 1 - 4 - 8 DMBA-Injektionen nach jeweils 3(9) Wochen (5 Tage nach der Transfusion)

Interessanterweise steigen neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion die durchschnittlichen Proliferationsindices wieder an (Tabelle 18a,b im Anhang und Abbildungen 15, 16).

Mit 255% beziehungsweise 187% der Kontrolle am dritten und fünften Tag nach der Transfusion der Spenderknochenmarkszellen erreichten sie ein ähnliches Niveau wie dies nach vier Cancerogenapplikationen (Tab. 16a,b, S. 108 Anhang) zu beobachten war. Dabei wird die Steigerung der Proliferationsindices hauptsächlich durch eine starke Reduktion der CFU-S auf 38% der Kontrolle (Tab. 4c) verursacht, während die inkorporierte Radioaktivität nahezu konstant blieb.

Die Tabellen 12a, b zeigen die Proliferationsindices neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion für den dritten und fünften Tag nach der Transfusion (Erklärung der Differenzgröße Δ% siehe Tab. 10a).

Tabelle 12a: Proliferationsindex neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion (drei Tage nach der Transfusion)

3 d	$\frac{cpm/1.10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/1.10^6\ tZ}$		
Anzahl der 7,12 DMBA-Injektionen	Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle in Δ%
9 Wochen nach der achten DMBA-Injekt.	6,0 ± 0,3	15,0 ± 0,3	+ 155%

Tabelle 12b: Proliferationsindex neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion (fünf Tage nach der Transfusion)

5 d	$\frac{cpm/1.10^6\ tZ}{CFU\text{-}S/1.10^6\ tZ}$		
Anzahl der 7,12 DMBA-Injektionen	Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle in Δ%
9 Wochen nach der achten	122,0 ± 19,1	228,0 ± 9,9	+ 87%

Die Tabelle 19a,b (im Anhang) und die Abbildungen 17, 18 stellen die Proliferationsindices der einzelnen Verumgruppen im Verlauf von acht DMBA-Injektionen im Bezug

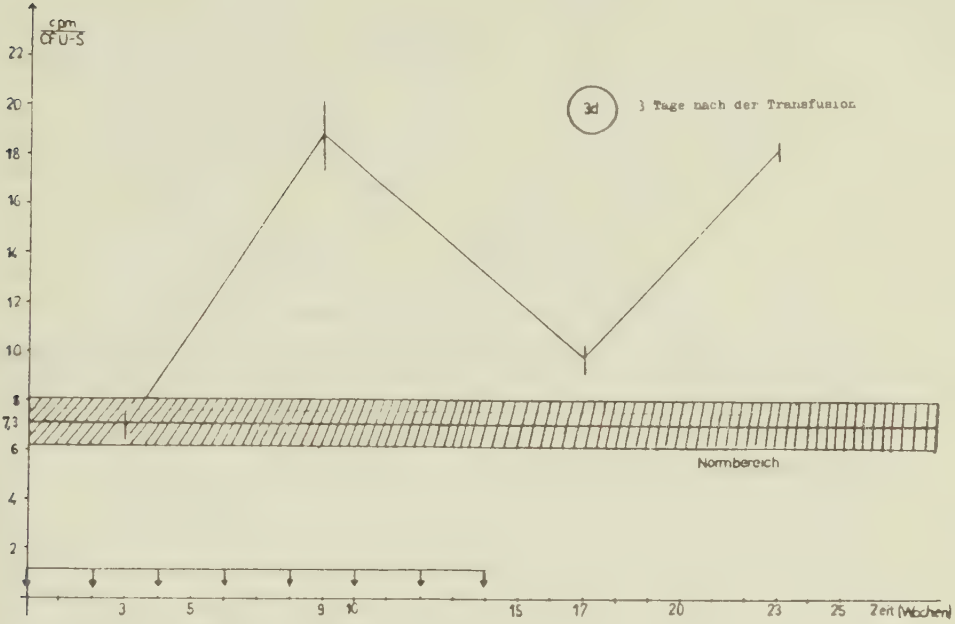


Abb. 17: Normalisierter Proliferationsindex $\frac{cpm}{CFU\text{-}S}$

unter 8 intraperitonealen DMBA-Injektionen von je 1 mg in 14-tägigem Abstand (3 Tage nach der Transfusion)

zu einem definierten Normbereich zusammen. Die Darstellungen in den Abbildungen 17 und 18 für den dritten und fünften Tag nach der Transfusion ähneln sich sehr stark und zeigen eine signifikante Abweichung der Proliferationsindices drei Wochen nach vier und neun Wochen nach acht DMBA-Injektionen.

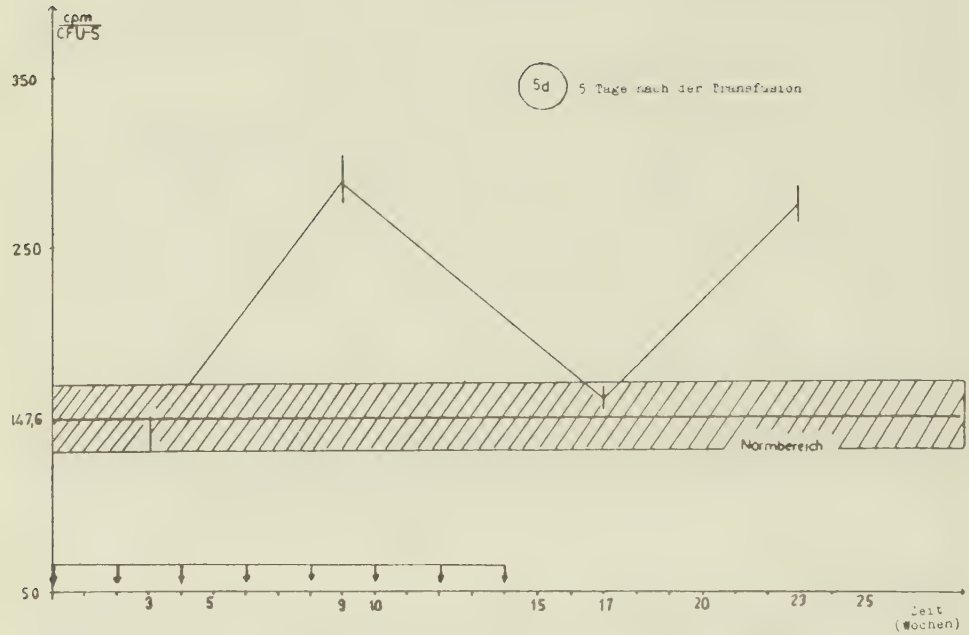


Abb. 18: Normalisierter Proliferationsindex $\frac{cpm}{CFU\text{-}S}$

unter 8 intraperitonealen DMBA-Injektionen von je 1 mg in 14-tägigem Abstand (5 Tage nach der Transfusion)

4. Diskussion

7,12 Dimethylbenzanthracen beeinträchtigt die Proliferationsaktivität der Knochenmark-Stammzelle und ihrer sich teilenden Nachkommenschaft in einer komplexen Weise. Um die chronische Schädigung des Knochenmarks und seiner einzelnen Kompartimente durch das Cancerogen besser verstehen zu können, erfolgt einleitend eine kurze Darstellung der Eigenschaften und Funktionen des hämopoietischen Systems.

4.1. Aufbau und Funktion des hämopoietischen Systems

Das Knochenmark kann in drei sich überlappende Kompartimente eingeteilt werden (72):

1. Das erste Kompartiment enthält die pluripotenten Stammzellen (PSC), die entweder sich selbst regenerieren oder in weiter entwickelte Stufen differenzieren, worauf die neu gebildeten Zellen in die folgenden Kompartimente abwandern. Die PSC machen nur etwa ein 1/1000 aller kernhaltigen Knochenmarkszellen aus (91). Normalerweise sind 5 - 10% der PSC in der S-Phase, während der größte Teil der restlichen 90% sich in einem Ruhestadium (G_o) befindet und als "Stammzellreserve" dient. Die Entscheidung, ob aus der Stammzelle neue Stammzellen oder differenzierte Nachkommen hervorgehen, unterliegt sowohl progressiven als auch stochastischen Einflüssen (61). Korn et al. (61) nehmen für jede Entwicklungsstufe eine bestimmte Wahrscheinlichkeit an, daß die Zelle sich weiter differenziert oder sich selbst erneuert. Während bei der Stammzelle die erste Wahrscheinlichkeit kleiner ist, wird sie bei einer reiferen Zelle, die weniger zur Selbstregeneration befähigt ist, größer. Die Proliferationsaktivität der CFU-S kann durch die lokale CFU-S-Konzentration beeinflußt werden (72). So beginnen die CFU-S sofort mit der aktiven Zellteilung, wenn sie in Knochen implantiert werden, die zuvor durch letale Bestrahlung ihr Knochenmark verloren haben. Toksöz et al. (102) zeigten in diesem Zusammenhang, daß die Stammzellproliferation durch ein subtiles Gleichgewicht zwischen DNA-Synthese-Inhibitoren (NBME fraction 4 =

normal bone marrow extract) und DNA-Synthese-Stimulatoren (RBME fraction 3 = regeneration bone marrow extract) reguliert wird. So fanden sie einen Tag nach der Ausdünnung der CFU-S im Nährmedium eine höhere Konzentration des Stimulators (RBME), während eine Woche danach die CFU-S-Population dichter wurde und nun die Konzentration des Inhibitors (NBME) die des Stimulators übertraf. Die NBME-Fraktion 4 (Molekulargewicht 50000 - 100000 daltons) und die RBME-Fraktion 3 (Molekulargewicht 30000 - 50000 daltons) beeinflussen spezifisch nur die CFU-S, nicht aber die CFU-C.

Nicht nur lokale, sondern auch extramedulläre Faktoren greifen in die Regulation der Stammzellproliferation ein. Pessina et al. (77) konnten durch eine Vorbehandlung des Knochenmarks mit Ehrlich-Tumor-Aszitesflüssigkeit (Peritonealaszites von Mäusen mit einem transplantablen Ehrlich-Tumor) eine Reduktion der CFU-S auf bis zu 50% erzeugen. Dabei waren vor allem die erythroiden Kolonien betroffen, während die undifferenzierten Kolonien im Gegensatz dazu stark zunahmen.

2. Das zweite und dritte Kompartiment.

Die beiden darauffolgenden Kompartimente werden von Siegers et al. (91) und Ogawa et al. (72) unterschiedlich definiert:

Siegers et al. (91) ordnen dem zweiten Kompartiment determinierte Zellen (CSC: committed stem cells) zu, die sich nur noch innerhalb einer bestimmten Zellreihe differenzieren können. Der CSC-Speicher ist 30 mal größer als das PSC-Kompartiment. Beide Zellpopulationen zusammen machen etwa 3% aller kernhaltigen Knochenmarkszellen aus (91). Das zweite Kompartiment verlassen 3.10^4 Zellen/g Körpergewicht/h, um im dritten Knochenmarksteil, dem Differenzierungsspeicher, endgültig auszureifen. Dort laufen bis zur voll differenzierten Zelle noch vier Zellteilungszyklen ab, so daß $47,2.10^4$ Zellen/g Körpergewicht/h aus dem Knochenmark in die Blutbahn gelangen.

Demgegenüber finden nach Ogawa et al. (72) nur im zweiten Kompartiment Zellteilungen statt. Die Zellen dieses Knochenmarksanteils sind determinierte CSC's und durch humorale Regulatoren wie das Erythropoietin zu beeinflussen. Bei bakteriellen Infekten oder Blutverlust ist es hauptsächlich dieses Kompartiment, das den erhöhten Bedarf durch gesteigerte Proliferationstätigkeit zu befriedigen hat. Das dritte mitotisch inaktive Kompartiment hat nach Ogawa et al. (72) den Charakter eines Reifungspeichers, der sehr schnell entleert werden kann und so zu einem schubartigen Anstieg der in der Peripherie geforderten Zellen im Blut führt.

Die schematische Einteilung des Knochenmarks in einzelne Kompartimente sollte dynamisch gesehen werden: Die sich überlappenden Systeme befinden sich in stetiger Bewegung, in stetigem Fluß von unreif nach reif. Ein komplexes Kontrollsystem innerhalb des Knochenmarks regelt den Zufluß und Abfluß zwischen den einzelnen Kompartimenten, so daß ein Fließgleichgewicht aufrecht erhalten wird.

4.2. Reduktion des Proliferationsfaktors durch 7,12 DMBA

In der Vergangenheit wurden hauptsächlich nur die akuten Schäden, die durch 7,12 DMBA im Organismus verursacht werden, ausführlich untersucht (siehe Kapitel 1.2.4.):

48 Stunden nach einer intravenösen Cancerogenapplikation wär die Reduktion des Milzgewichts bis auf 60% der Kontrolle festzustellen (103). Dabei stand die Schädigung der roten Pulpa mit erythroiden und myeloiden Zellen im Vordergrund, während die Lymphozyten in der weißen Pulpa keinen signifikanten Rückgang erfuhren.

In den ersten Tagen nach einer peroralen DMBA-Applikation verschob sich die Knochenmarkspopulation zugunsten der weniger differenzierten Zellen (89). Eine Woche nach der vierten DMBA-Injektion (100 mg/kg in zweiwöchigen In-

tervallen) waren die Leukozytenkonzentrationen im peripheren Blut auf ein Drittel des Normwertes gefallen, wobei hauptsächlich die Lymphozyten reduziert waren (103).

7,12 DMBA setzt aber auch chronische Schäden, die unter anderem eine Leukämie zur Folge haben können. Ausdruck eines bleibenden Restschadens ist die Änderung der Proliferationsaktivität der Knochenmark-Stammzelle und ihrer proliferierenden Nachkommen. Ein Parameter, der diese Aktivitätsänderungen erfassen kann, ist der in der vorliegenden Arbeit gemessene Proliferationsfaktor:

Drei Wochen nach einer intraperitonealen DMBA-Injektion von 1 mg fällt zwar der Proliferationsfaktor auf 87,4% der Kontrolle (S. 104, Anhang), doch wird erst drei Wochen nach der vierten DMBA-Applikation mit 78,7% der Kontrolle (S. 105) der Normbereich signifikant unterschritten.

Mit der Zahl der DMBA-Injektion akkumuliert der Schaden im Stammzellkompartiment und in der proliferierenden Nachkommenschaft. Dies dürfte auf der Phasenspezifität des Cancerogens beruhen, welches nur die proliferierenden Zellen trifft, die sich in der S-Phase befinden. Die Reduktion des Proliferationsfaktors verläuft nicht linear. Zwischen der vierten und der achten DMBA-Applikation fällt der PF nur noch geringfügig. Drei Wochen nach der achten DMBA-Injektion bleibt er mit 77,4% der Kontrolle (S.106) nahezu konstant.

Die persistierende Schädigung der Knochenmarksstammzelle und ihrer proliferierenden Nachkommenschaft wird nach einer längeren Erholungszeit besonders deutlich. Neun Wochen nach der achten DMBA-Applikation bleibt der PF mit 75% der Kontrolle (Tab. 8a) auf seinem niedrigen Niveau.

Interessant ist die Gegenüberstellung von 7,12 DMBA und alkylierenden Substanzen bezüglich ihrer Fähigkeit, den Proliferationsfaktor zu reduzieren. Hübner und Cronkite (47b) wendeten den Stammzell-Qualitätstest zur Untersuchung von Methylnitrosurea (MNU), Busulfan (BU) und Cyclophosphamid (CP) an:

Drei Wochen nach der einmaligen Applikation von	Reduktion des Proliferationsfaktors in % der Kontrolle
50 mg/kg MNU	68%
20 mg/kg BU	70%
200 mg/kg CP	57%

Auffallend ist, daß diese chemischen Noxen einen schwereren akuten Schaden bezüglich der Proliferationsaktivität setzen als dies beim 7,12 DMBA der Fall war. Denn drei Wochen nach einer einmaligen Gabe von 50 mg/kg 7,12 DMBA (= 1 mg/20 g Maus) fiel der Proliferationsfaktor nur auf 87,4% der Kontrolle. Auch setzt die Erholung des proliferierenden Zellkompartiments nach 7,12 DMBA früher ein, als dies nach den alkylierenden Substanzen der Fall war. So erreicht der Proliferationsfaktor nach MNU erst nach 15 Wochen den Normbereich, während nach BU und CP auch nach 15 Wochen noch keine Normwerte zu verzeichnen sind (47b). Bei 7,12 DMBA wurde der Normbereich schon nach neun Wochen erreicht.

Eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu 7,12 DMBA stärkere Reduktion des Proliferationsfaktors durch die alkylierenden Substanzen ist die hohe Metabolisierungsrate des Cancerogens. So werden innerhalb von drei Stunden nach einer DMBA-Injektion 40% dieser Substanz konjugiert über die Galle ausgeschieden (58). Außerdem reagieren die alkylierenden Substanzen in jedem Stadium des Zellzyklus, indem sie die beiden Stränge der DNA miteinander vernetzen und dadurch Reduplikation und Transskription stören. Im Gegensatz dazu blockiert 7,12 DMBA den Zellzyklus nur in der S-Phase, wobei die Bindungsrate mit 0,7 Molekülen pro 200000 Nukleotideinheiten relativ gering ausfällt (4).

4.3. Ursachen der Reduktion des Proliferationsfaktors durch 7,12 DMBA

Zwischen der Stammzellschädigung durch Bestrahlung und der Schädigung durch das Cancerogen können gewisse Parallelen angenommen werden: Beide Noxen verursachen nach einer bestimmten Latenzzeit jeweils in hohen Prozentsätzen Leukämien (25,110). Die Mitosezykluszeiten der proliferierenden Zellen werden vergleichbar verlängert,und bei beiden Schädigungen können auch nach längeren Erholungszeiten Restschäden innerhalb des Stammzellkompartiments festgestellt werden (83,106).

Die Reduktion des Proliferationsfaktors nach einer 500 rad -Bestrahlung wird auf drei Faktoren zurückgeführt (106):

a) Verlängerung des Mitosezyklus
b) Reduzierte Selbsterhaltungsfähigkeit der Stammzelle
c) Förderung der Differenzierung und Reifung in der Stammzellnachkommenschaft.

Die Reduktion des Proliferationsfaktors nach mehrmaliger DMBA-Applikation dürfte ähnliche Ursachen haben:

ad a) Die mitotische Aktivität von kultivierten Hamsterembryozellen wird durch das Cancerogen akut und reversibel um bis zu 50% reduziert (4). Nach der Einwirkung von 7,12 DMBA-3,4-dihydriol sind wie nach Bestrahlung vermehrt Chromosomenbrüche und SCE's festzustellen (74).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Verlängerung der Zellverdopplungszeit nach der chronischen Applikation von 7,12 DMBA gefunden: Die größte Zeitdifferenz zur Kontrolle wurde neun Wochen nach der achten Applikation erreicht. Während die Verdopplungszeit bei der Kontrolle im Mittel 10,97h $\pm$ 0,22h betrug, stieg sie neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion auf 12,11h $\pm$ 0,49h an (Tab. 9). Dies spricht für eine gleichzeitige Verlängerung des Mitosezyklus.

ad b) Innerhalb von 24 Stunden führt eine perorale DMBA-Applikation von 1 mg zu einer starken Reduktion sowohl der CFU-S als auch der CFU-C (50 - 70% der Kontrolle (89)).

In dieser Arbeit war ebenfalls eine deutliche Reduktion der CFU-S festzustellen: Drei Wochen nach einer DMBA-Injektion lagen die CFU-S/Femur mit 79% der Kontrolle (Tab. 3) schon unterhalb des Normbereichs. Selbst neun Wochen nach der achten DMBA-Applikation blieben die CFU-S/Femur mit 38% der Kontrolle (Tab. 4c) stark reduziert. Das spricht für eine persistierende Störung der Selbsterhaltungsfähigkeit des Stammzellkompartiments.

ad c) Die Förderung der Differenzierung und Reifung in der Stammzellnachkommenschaft wurde in der vorliegenden Arbeit nicht direkt gemessen. Als ein Hinweis für diese Beschleunigung kann jedoch das Auftreten von Reifungsstörungen gewertet werden. Die Beschleunigung der Differenzierungs- und Reifungsvorgänge innerhalb der Stammzellnachkommenschaft hat eine geringere Amplifikation und daher einen mangelhaften Nachschub in die Peripherie zur Folge. Offenbar verlassen aus diesem Grund unreifere Zellen vor Beendigung ihrer Ausreifung überstürzt den Differenzierungsspeicher (3. Kompartiment nach Siegers et al. (91)), um den akuten Mangel in der Peripherie zu kompensieren. In der vorliegenden Arbeit fanden sich derartige Veränderungen des Differential-Blutbildes. Sieben Tage nach der sechsten Applikation des Cancerogens traten im Mittel 20 % unreifere myeloide Vorstufen auf. Die Lymphozyten waren gleichzeitig reduziert.

4.4. Zellverdopplungszeit und Zellverlust aus der Milz im Beobachtungszeitraum des Qualitätstests

Der Proliferationsfaktor ist eine Größe, die von dem Verhältnis zwischen der inkorporierten Radioaktivität am fünften Tag und der des dritten Tages abhängig ist. Es ist also von Bedeutung, wenn am dritten Tag nach der Transfusion Zellen in der Milz markiert werden, deren Nachkommenschaft am fünften Tag aufgrund der in Kapitel 4.3. Punkt c) erwähnten Förderung der Reifungs- und Differenzierungsvorgänge schon die Milz verlassen haben und somit nicht mehr markiert werden können.

v. Wangenheim et al. (106) stellten fest, daß im Mittel 52% der inkorporierten Radioaktivität bei Kontrolltieren zwischen dem dritten und fünften Tag aus der Milz "verlorengehen". Bei den Empfängermilzen der Verumgruppe, die bestrahlte Knochenmarkszellen erhielten, war der Radioaktivitätsverlust stärker. Drei Wochen nach einer 500-rad-Bestrahlung beträgt die Verlustdifferenz zwischen Kontroll- und Verumgruppe 8,9%. Bei beiden Gruppen wird der Radioaktivitätsverlust zwischen dem dritten und fünften Tag wahrscheinlich durch die Ausschwemmung ausgereifter und differenzierter Zellen verursacht.

Die Folge ist, daß am fünften Tag eine erniedrigte Inkorporierte Radioaktivität gemessen wird. Der Radioaktivitätsbeziehungsweise Zellverlust wird dann berücksichtigt, wenn ein modifizierter Proliferationsfaktor, wie folgt, definiert wird:

$$Q = \frac{\text{cpm in am 5. Tag markierten \& gemessenen Milzen}}{\text{cpm in am 3. Tag markierten \& am 5. Tag gemessenen Milzen}} \qquad (106)$$

Die Verdopplungszeit (t_d) proliferierender Zellen verhält sich umgekehrt proportional zum Faktor Q:

$$t_d = 48\ h \frac{\ln 2}{\ln Q} \qquad (106)$$

Aufgrund des Zellverlustes ist Q größer als PF. Umgekehrt verkürzt sich die Zellverdopplungszeit, wenn sie mit Hilfe des Faktors Q (anstelle von PF) ermittelt wird.

Die Differenz des Radioaktivitätsverlustes zwischen Kontroll- und Verumgruppe ist auch von der Erholungszeit nach der Schädigung abhängig (106):

Acht Tage nach der 500 rad - Bestrahlung beträgt sie 21,7% d.K., um nach einer Erholungszeit von zwölf Monaten auf nur 2,1% d.K. zu sinken (106). Der höhere Radioaktivitätsverlust wird durch die beschleunigte Zelldifferenzierung und -reifung verursacht. Sie bleibt solange bestehen wie defekte Stammzellen vorhanden sind. Offenbar kommt es erst durch den Austausch von geschädigten durch ungeschädigte Stammzellen zur Reduktion des Radioaktivitäts- bzw. Zellverlustes.

Da in der vorliegenden Arbeit eine Messung des Zellverlustes nicht erfolgte, wurde die Verlängerung der Zellverdopplungszeit auf der Basis der experimentell ermittelten Proliferationsfaktoren errechnet:

	$t_d = 48h \frac{\ln 2}{\ln PF}$
Kontrolle	10,97h ± 0,22h
3 Wochen n. 1 DMBA-Inj.	11,38h ± 0,28h
3 Wochen n. 4 DMBA-Inj.	11,95h ± 0,37h
3 Wochen n. 8 DMBA-Inj.	11,94h ± 0,31h
9 Wochen n. 8 DMBA-Inj.	12,11h ± 0,49h

Bemerkenswert ist, daß die Zellverdopplungszeit neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion keine Tendenz zur Normalisierung zeigt, sondern eher noch zunimmt. Dies kann ein möglicher Hinweis auf den Beginn einer Leukämie sein, denn leukämische Blastenzellen weisen bei einer akuten myeloischen Leukämie verlängerte Mitosezykluszeiten auf (83).

Andererseits zeigte während der Beobachtungszeit von insgesamt 23 Wochen kein Versuchstier das Vollbild einer Leukämie. Dies ist durch die sehr lange Latenzzeit bei den C57 black-Mäusen bedingt: Nur 24,4% dieser Tiere erkrankten mit einer mittleren Latenzzeit von 148 Tagen nach einer einmaligen DMBA-Applikation an Leukämie. Demgegenüber zeigten "Swiss-Mice" zu 84% nach durchschnittlich 114 Tagen ein leukämisches Blutbild (71a).

In dieser Arbeit konnte selbst durch mehrfache DMBA-Applikation die Latenzzeit bis zum ersten Auftreten einer Leukämie nicht verkürzt werden. Der Proliferationsfaktor wurde demnach in der Initialphase der Leukämie untersucht.

4.5. Zusammenhang zwischen der Reduktion des Proliferationsfaktors und der CFU-S-Zahl

Nach einer 500 rad - Bestrahlung verliefen die Erholung des Proliferationsfaktors und der entsprechenden CFU-S-Anzahl pro Femur nahezu parallel. Beide Größen erreichten auch ein Jahr nach der Schädigung nicht den Normbereich (107). Im Gegensatz dazu zeigten CFU-S/Femur und Proliferationsfaktor (PF) nach der mehrmaligen Applikation von 7,12 DMBA eine divergierende Entwicklung: Die Reduktion der CFU-S/Femur drei Wochen nach der vierten DMBA-Applikation fiel mit 53% der Kontrolle stärker aus als der Rückgang des entsprechenden PF's (78,7% d.K.).

Drei Wochen nach der achten DMBA-Injektion zeigten beide Größen gegenüber der 4 mg - Gruppe keine nennenswerten Veränderungen (CFU-S/Femur: 58% d.K.; PF: 77,4% d.K.).

Sechs Wochen später erfuhr die CFU-S-Anzahl/Femur eine erneute Reduktion (38% d.K.), während der PF mit 75% d.K. weiterhin nahezu konstant blieb.

Die Diskrepanz zwischen beiden Größen wird noch deutlicher, wenn sie direkt zueinander in Beziehung gesetzt werden: Der Proliferationsindex ist definiert als das Verhältnis zwischen der inkorporierten Radioaktivität/1.10^6 transfundierte Zellen und den CFU-S/1.10^6 transfundierte Zellen.

4.5.1. Diskrepanz zwischen inkorporierter Radioaktivität und Anzahl der transfundierten CFU-S nach mehrmaliger DMBA-Applikation

Drei Wochen nach der vierten und neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion erreicht der Proliferationsindex besonders hohe Werte. Dies ist Ausdruck der im Kapitel 4.5 aufgezeigten unterschiedlichen Entwicklung der inkorporierten Radioaktivität und der CFU-S. Das divergierende Verhalten beider Größen könnte durch zwei verschiedene Mechanismen zustande kommen:

1. Hypothese: Verschiebungen zwischen 1. und 2. Knochenmarks-Kompartiment

Voraussetzung für die nachfolgenden theoretischen Überlegungen ist die Annahme, daß die Anzahl der CFU-S und die gemessene inkorporierte Radioaktität in der Empfängermilz ungefähr den Zustand des Spenderknochenmarks widerspiegeln und der Proliferationsindex damit das Verhältnis zwischen der proliferierenden Nachkommenschaft und der Anzahl der CFU-S beschreibt.

Der Anstieg des Proliferationsindexes drei Wochen nach der vierten DMBA-Injektion (247% d.K. am dritten und 191% d.K. am fünften Tag. Tab. 16a und b, Anhang) wurde hauptsächlich durch einen starken Abfall der CFU-S/1.10^6 transfundierte Zellen verursacht, während die inkorporierte Radioaktivität fast konstant blieb (Tab. 16a und b, Anhang). Die Diskrepanz im Verhalten beider Größen könnte durch eine Änderung der Zusammensetzung des proliferierenden Zellpools im Spender-

knochenmark zustandekommen. Das erste Kompartiment würde demnach durch die DMBA-Einwirkung so geschädigt, daß der notwendige Nachschub in die folgenden Kompartimente fehlt. Durch einen Proliferationsstimulus im zweiten Kompartiment versucht der Organismus den Ausfall des Stammzellkompartiments auszugleichen. Gleichzeitig erfolgt durch einen Differenzierungsstimulus eine Ausschleusung von unreiferen Zellen aus dem Determinationsspeicher. Das derart erweiterte zweite Kompartiment übernimmt demnach wichtige Funktionen vom defekten Stammzellkompartiment. Anscheinend weisen unter außergewöhnlichen Umständen die determinierten Zellen die Fähigkeit zur Selbsterhaltung auf. Insgesamt nähme die Anzahl der Stammzellen je 1.10^6 kernhaltige Zellen zugunsten der determinierten Zellen ab. Für die Möglichkeit einer solchen Verschiebung gibt es Hinweise: Drei Wochen nach einer 500 rad Bestrahlung war im Knochenmark das Verhältnis CFU-C/CFU-S mehr als doppelt so hoch wie in der unbestrahlten Kontrollgruppe. Auch war die Anzahl der determinierten Zellen aus der erythropoietischen Reihe bezogen auf die CFU-S erhöht (106).

CFU-C sind Zellkolonien formende Zellen, die zur granulozytisch/makrophagisch determinierten Zellreihe gehören.

Die Steigerung der Proliferationsindices drei Wochen nach der vierten DMBA-Injektion könnte also durch die gesteigerte Proliferation der determinierten Nachkommenschaft zustandekommen, so daß die Reduktion der CFU-S mehr als kompensiert wird. Die Hyperplasie des Knochenmarks (120% d.K., Tab. 2a) zu diesem Zeitpunkt gibt ebenfalls einen Hinweis auf eine gesteigerte Proliferationsleistung des Determinationsspeichers. Auch bleiben die Leukozytenzahlen im peripheren Blut bei den Spendertieren zwei Wochen nach der vierten Cancerogengabe im Normbereich (90% d.K., Tab. 1), obwohl gleichzeitig die CFU-S schon stark reduziert sind (Tab. 4a).

Das bei der Verumgruppe stark erweiterte Knochenmark-Determinationskompartiment (Kompartiment 2 in Kapitel 4.1.) könnte eine stärkere Ausschwemmung ausdifferenzierter, rei-

fer Zellen zwischen dem dritten und fünften Tag aus der Milz bewirken und somit zu einem höheren Radioaktivitätsverlust als bei der Kontrolle führen. Dadurch würde sich der Quotient cpm Tag 5/cpm Tag 3, also der Proliferationsfaktor, verkleinern.

Drei Wochen nach der achten Cancerogenapplikation (insgesamt 8 mg DMBA) fielen die Proliferationsindices gegenüber den entsprechenden Werten der 4 mg-Gruppe (Tab. 16a und b, Anhang) stark ab. Sie betrugen 134% d.K. am dritten und 103% d.K. am fünften Tag (Tab. 17a und b, Anhang). Der Rückgang der Proliferationsindices auf fast normale Werte wurde dabei durch die deutliche Reduktion der inkorporierten Radioaktivität verursacht, während die CFU-S/1.10^6 transfundierte Zellen nach 8 mg DMBA auf ihrem niedrigen Niveau nahezu konstant blieben (Tab. 17a und b, Anhang). Drei Wochen nach der achten DMBA-Injektion scheint demnach neben der Schädigung des Stammzellspeichers auch das zweite Kompartiment reduziert zu sein. Wahrscheinlich werden während der chronischen Cancerogeneinwirkung so viele differenzierte Zellen von der Peripherie angefordert, daß die (unter außergewöhnlichen Umständen) bestehende Selbsterhaltungsfähigkeit der determinierten Zellen nicht ausreicht, um den ursprünglichen Umfang des zweiten Kompartiments wieder zu erreichen. Die Abnahme der inkorporierten Radioaktivität gegenüber den Werten der 4 mg-Gruppe würde somit der Reduktion des Determinationsspeichers entsprechen. Hinweise für diese Schädigungslokalisation sind das Ausbleiben der Knochenmarkshyperplasie drei Wochen nach der achten Applikation und der Leukozytenabfall eine Woche nach der sechsten DMBA-Injektion (58% d.K., Tab. 1). Durch die nicht mehr vorhandene Erweiterung des zweiten Kompartiments drei Wochen nach der achten Applikation spielt möglicherweise ein erhöhter Zellverlust aus der Milz zwischen dem dritten und fünften Tag nicht mehr die gleiche Rolle wie bei der 4 mg-Gruppe.

Trotz der gegenüber der 4 mg-Gruppe reduzierten Proliferationsaktivität des zweiten Kompartiments erreichte drei Wochen nach der achten DMBA-Applikation die Leukozytenzahl im peripheren Blut bei den Spendern 78% d.K. (Tab. 1).

Es ist möglich, daß aufgrund der festgestellten Veränderungen im Differentialblutbild (siehe S. 32) - also durch eine Akkumulation unreifer Vorstufen im peripheren Blut, die durch ihren Reifungsrückstand eine verlängerte Aufenthaltsdauer in der Blutbahn haben (25) - eine deutlichere Reduktion der Leukozytenzahl ausbleibt.

Neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion stiegen die Proliferationsindices gegenüber den Werten sechs Wochen vorher wieder an (255% d.K. am dritten und 187% d.K. am fünften Tag, Tab. 18a und b, Anhang). Dabei erreichten sie ein ähnliches Niveau, wie dies nach vier Cancerogenapplikationen (Tab. 16a und b, Anhang) zu beobachten war.

Auch hier war die Steigerung der Proliferationsindices auf die Reduktion der CFU-S/1.10^6 tr. Zellen zurückzuführen, während die inkorporierte Radioaktivität auf ihrem niedrigen Niveau konstant blieb (Tab. 18a und b).

Bemerkenswert ist, daß selbst neun Wochen nach der achten Applikation schwere Restschäden in mehreren Kompartimenten des Knochenmarks bestehen und auch keine Tendenz zu einer Erholung sichtbar werden.

2. Hypothese: Residualschaden im 1. Kompartiment:

Während in der ersten Hypothese von einer aktiven Erweiterung des zweiten Kompartiments zur Kompensation der Schädigung des Stammzellspeichers ausgegangen wurde, erfährt in der zweiten Hypothese das Determinations-Kompartiment durch verstärkte Determination im ersten Kompartiment eine Erweiterung. Es ist denkbar, daß "ältere" CFU-S, die gerade auf der Schwelle zur Determination stehen, durch einen erhöhten Differenzierungsstimulus aus der Peripherie verstärkt in das zweite Kompartiment gelangen. Gleichzeitig würden die mitotisch besonders aktiven, "jüngeren" CFU-S durch das Cancerogen präferentiell zerstört. Diese Veränderungen hätten einen erhöhten Zellverlust aus der Milz im Beobachtungszeitraum des Qualitätstests zur Folge.

Magli et al. (65) zeigten, daß 50-80% der Milzkolonien am siebten Tag nach der Transfusion vorübergehende (transiente)

Kolonien waren, die weder zur Selbsterhaltung fähig noch zur Etablierung verschiedener Zell-Linien in einer Kultur in der Lage waren. Am zwölften Tag nach der Transfusion konnten nur 50-20% der 7-Tage-Kolonien wiedergefunden werden (persistente Kolonien). Sie enthalten zum größten Teil Stammzellen (65).

Wenn 7,12 DMBA präferentiell die jüngeren Stammzellen mit guter Selbsterhaltungsfähigkeit abtötet, sollte der Anteil der transienten Kolonien am siebten Tag ansteigen und entsprechend der Kolonienzuwachs bis zum zwölften Tag, wenn die transienten Kolonien aufgelöst sind, geringer ausfallen als bei der Kontrolle. Untersuchungen nach adäquater Schädigung durch Bestrahlung (107) fanden im Gegenteil sogar einen höheren Milzkolonienzuwachs am zwölften Tag im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Anstieg muß auf überlebende Stammzellen zurückzuführen sein, so daß eine Verkleinerung des ersten Kompartiments durch bevorzugte Zerstörung der "jüngeren" Stammzellen als Ursache für die persistierende Reduktion der Milzkolonien am siebten Tag nach der Transfusion unwahrscheinlich ist.

Die am zwölften Tag nach der Transfusion gefundenen Milzkolonien der bestrahlten Gruppe wiesen einen kleineren Durchmesser als die der Kontrollgruppe auf (107). Dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen Residualschaden im Stammzellkompartiment sein. Es wäre also auch möglich, daß diese Kolonien aufgrund einer reduzierten Proliferationsleistung der bestrahlten Stammzellen und deren Nachkommenschaft am siebten Tag makroskopisch noch nicht erfaßbar waren, erst am zwölften Tag mitgezählt wurden und somit den über der Norm liegenden Anstieg der Kolonienzahl verursachten. Die reduzierte Proliferationsaktivität der Stammzellen wäre dabei als ein durch die Bestrahlung induzierter Restschaden aufzufassen.

Die Zellen des Stammzell-Kompartiments würden entsprechend dieser Hypothese nach Bestrahlung oder 7,12 DMBA-Behandlung auf zweierlei Weise reagieren:

a) Ein Teil würde sofort oder spätestens nach dem Durchlaufen eines Zellzyklus zerstört.

b) In der zweiten Gruppe führen subletale, genetische Defekte - chromosomale Läsionen - in einem Teil der Stammzellen zu einem verlängerten Mitosezyklus und daher zu vermehrter Zytoplasmaproduktion je Zyklus (105). Hierdurch erhöht sich die Differenzierungswahrscheinlichkeit der Stammzellen, und deren Nachkommenschaft durchläuft weniger Mitosezyklen bis zur Ausdifferenzierung und Reife (vorzeitige Ausdifferenzierung s. Kap. 4.6.4). Die persistierende Erhöhung der Zellverlustrate zwischen Tag drei und fünf würde demnach durch defekte Stammzellen verursacht.

Die Stammzellen der zweiten Gruppe würden aufgrund der reduzierten Proliferationsaktivität kleinere Milzkolonien bilden, die zum größten Teil erst am zwölften Tag makroskopisch erfaßbar sind.

4.6. Mechanismus der Leukämogenese

Die Änderungen des Proliferationsfaktors stehen in einer engen Beziehung zur Leukämie. Durch radioaktive Markierung leukämischer Zellen gelang der Nachweis einer verlängerten Mitosezykluszeit (83) und einer verzögerten Migration aus der Blutbahn in das Gewebe (25). Beides ist Ausdruck einer gestörten Proliferations- und Differenzierungsleistung der pathologischen Zellen.

4.6.1. Klinische Aspekte der Leukämie

Die Leukämie beginnt im ersten Knochenmarkskompartiment durch die Veränderung einer oder mehrerer Stammzellen. Dabei wird das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung gestört.

Cronkite (25) hat die Leukämie als eine Krankheit bezeichnet, bei der eine abnorme Proliferation der weißen Zellreihe im Vordergrund steht. Weiterhin ist sie durch

eine defekte Zellreifung und eine Störung des "steady state" bei der Zellproliferation gekennzeichnet. Wird eine Stammzelle leukämisch, so wird dies durch eine Änderung ihres zellkinetischen Verhaltens deutlich.

Sánchez-Fayos et al. (83) untersuchten bei 20 Patienten mit akuter myeloblastischer Leukämie den Mitoseindex, den ^{3}H-TdR-Markierungsindex und die Mitosezeit von leukämischen Blastenzellen (LBC) und verglichen sie mit denen von normalen, sich teilenden, granulozytischen Vorstufen (DGP). Im Knochenmark wiesen die LBC sowohl bei dem Mitoseindex als auch bei dem ^{3}H-TdR-Markierungsindex signifikant geringere Werte als die DGP auf. Im peripheren Blut bestanden - wenn auch nicht so deutlich wie im Knochenmark - dieselben Differenzen zwischen LBC und DGP. Bemerkenswert war dabei, daß der Mitose- und der ^{3}H-TdR-Markierungsindex der Blut-LBC sehr viel niedriger lagen, als dies bei den Knochenmark-LBC der Fall war. Dies könnte bedeuten, daß die in das periphere Blut ausgeschleusten Zellen der LBC-Population zumindest teilweise nichtproliferierende Endzellen darstellen und die proliferierenden LBC im Knochenmark der akuten myeloblastischen Leukämie durch eine Knochenmark-Blut-Schranke zurückgehalten werden (83).

Diese Schranke ist aber nicht absolut. Douer et al. (34) fanden beispielsweise auch im Blut gesunder Probanden proliferierende, unreifere Zellen: Nach Impfung eines Kulturnährbodens mit 200000 kernhaltigen Blutzellen entstanden insgesamt 58 $\pm$ 15 Kolonien, davon 21 $\pm$ 13 CFU-GM (Granulozyten-Makrophagen-CFU) und 37 $\pm$ 7 BFU-E (erythroide burst forming units). Außerdem entdeckten sie in 1 ml Blut der gesunden Probanden bis zu 8 CFU-Mix (Stammzellkolonien, in denen sämtliche Blutzell-Linien vorhanden sind). Etwa die Hälfte der Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie wiesen 28 - 132 mal höhere CFU-Mix-Konzentrationen als die gesunden Kontrollpersonen auf. Auch war die Anzahl der CFU-GM und der BFU-E insgesamt stark erhöht. Das Verhältnis von CFU-GM zu BFU-E im peripheren Blut war zugunsten der CFU-GM verschoben. Als zwei der untersuchten Patienten einen Blastenschub entwickelten, waren keine CFU-Mix mehr vorhanden

und sowohl die CFU-GM als auch die BFU-E stark abgefallen. Die Assoziation des Anstiegs der CFU-Mix mit der Zunahme der differenzierteren CFU-GM und BFU-E macht deutlich, daß die Expansion des zweiten Knochenmark-Kompartiments Folge und Teil der Vergrößerung des Stammzell-Kompartiments ist. Aufgrund der primären Schädigung der Stammzelle bleibt die Veränderung des zellkinetischen Verhaltens nicht auf die weiße Zellreihe beschränkt. So verdoppelte sich fast die Mitosezykluszeit (83) der erythroiden Vorläufer im leukämischen Knochenmark. Somit wird auch die Generationszeit der pathologischen Zellen länger. Eine vergleichbare Verlängerung der Zellverdopplungszeit als Zeichen eines Restschadens der Zelle konnte in der vorliegenden Arbeit auch noch neun Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion beobachtet werden.

Die reduzierte Zellteilungsgeschwindigkeit kommt ebenfalls in dem sinkenden Proliferationsfaktor zum Ausdruck.

4.6.2. Onkogene, Genproduktdosistheorie und Promotorinsertionsmodell

Leukämie kann durch die verschiedensten Noxen hervorgerufen werden: Neben Bestrahlung (25) und chemischen Carcinogenen (48,78,110) sind auch Viren (96b) in der Lage, diese Krankheit zu induzieren. Es gibt Hinweise, daß diese leukämogenen Noxen wie alle krebserzeugenden Substanzen nur Auslöser, nicht aber Verursacher des Tumorwachstums sind. Der gemeinsame ätiologische Nenner für alle Krebsleiden scheint die Aktivierung zelleigener "Onkogene" zu sein.

Stehelin, Bishop et al. (8) stellten mittels molekularer Hybridisierungsversuche von Vogel-DNA einerseits und DNA-Kopien des viralen src-Gens (= das transformierende Gen des Sarkoma Virus, das bei Hühnern zur Bildung von entsprechenden Tumoren führt) fest, daß es in gesunden Vogelzellen Gene gab, die mit diesem viralen Onkogen bezüglich der Nukleinsäurensequenz identisch waren. Diese Abschnitte der zellulären DNA wurden c-src genannt. Auch in menschlichen Zellen wurden durch Spector (8) zelluläre "Onkogene" entdeckt.

Zuvor klärten Erikson et al. (36) und Levinson et al. (64) die Struktur und die Bedeutung des Proteins, das durch das virale src in der Gastzelle codiert wird, auf: Das Produkt - pp60v-src - ist eine Proteinkinase, besteht aus ungefähr 520 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 60000. Dieses Enzym, das selbst zwei phosphorylierte Aminosäuren (Serin und Tyrosin) trägt, phosphoryliert spezifisch die Aminosäure Tyrosin. Dieser Phosphortransfer spielt auch bei der Wachstumsregulation einer normalen Zelle eine wichtige Rolle. So nimmt man an, daß pp60v-src verschiedene Proteine phosphoryliert und damit ähnlich wie bei der hepatischen Induktion der Glycogenolyse endozelluläre Enzymsysteme kaskadenartig aktiviert.

Den Beweis für die spezifische Funktion des pp60v-src erbrachten Hunter et al. (49). Sie fanden nach einer Transformation durch das src-Gen in den transformierten Zellen die Menge phosphorylierter Tyrosinreste um das Zehnfache erhöht. Überraschend war, daß die Phosphokinase nicht in Zellkernnähe, wo sie direkten Einfluß auf die Expression der viralen DNA ausüben könnte, gefunden wurde, sondern hauptsächlich an die Plasmamembran gebunden war.

Rohrschneider (82) gelang der Nachweis, daß sich in Tumorzellen das pp60v-src-Protein an den sogenannten Adhäsionsplaques vermehrt befindet. Vielleicht liegt hier die Ursache für die Tendenz vieler Tumorzellen, sich aus ihrem Zellverband zu lösen und an entfernteren Stellen Metastasen zu bilden. Sefton et al. (88) entdeckte in diesem Zusammenhang, daß ein typischerweise in den Zellhaftstellen vorkommendes Protein - "Vinculin" - durch die Phosphorylierung aus den Adhäsionsplaques gelöst wird.

In gesunden Zellen vorkommende "Onkogene" stimmen mit viralen Onkogenen bis auf dazwischengeschaltete Introne überein. Dies und die Tatsache, daß diese Gene ubiquitär in allen Tierarten vorkommen, lassen vermuten, daß diese Erbinformation physiologische oder sogar essentielle Funktionen codiert (8). Daraus entwickelte Klein (60) die "Genproduktdosistheorie" der

Cancerogenese: Die Transformation einer Zelle in eine Tumorzelle wird durch die Erhöhung der endozellulären Konzentration eines Genprodukts ausgelöst, das in normaler Konzentration nicht das Verhalten einer neoplastisch transformierten Zelle bewirkt und in gesunden Zellen Schlüsselfunktionen bezüglich der Differenzierungskontrolle erfüllt (50).

Beweise für die physiologischen Funktionen der zellulären "Onkogene" in einer normalen Zelle fand Risser (81). Das zelluläre abl-Gen, das dem transformierenden Gen des ABL-Mul Virus (Abelson Murine Leukemia Virus) homolog ist, wird im regenerierenden Knochenmark von uninfizierten Mäusen transkribiert; erfüllt also Aufgaben im Rahmen der hämopoietischen Differenzierung. Chen (21) gelang der Nachweis, daß die Expression des c-myb in Hühnerzellen bei der Granulozytenreifung eine wichtige Rolle spielt. Das c-myb ist das homologe Gen zum viralen myb des AM-Virus (Avian Myoblastosis Virus). Auch das Produkt des zellulären sis-Onkogens, das mit dem transformierenden Gen des Simian Sarcoma Virus übereinstimmt, ist ein physiologisch vorkommendes Protein. So wiesen Waterfield et al. und Weiss (109) den PDGF (platelet derived growth factor) als das vom c-sis codierte Protein nach.

PDGF wird während der Thrombenbildung aus den alpha-Granula der Thrombozyten freigesetzt und ist ein Polypeptid-Wachstumsfaktor, der auch Fibroblasten und Neurogliazellen in eine gesteigerte Mitoseaktivität versetzen kann. Die gegenüber PDGF sensiblen Zellen besitzen spezielle PDGF-Rezeptoren (44), die nach Bindung des Wachstumsfaktors eine Tyrosin-spezifische Kinaseaktivität zeigen (35). Dies ist dieselbe Enzymaktivität wie bei den c-src-Genprodukten (36,64). Sporn und Todaro (96a) folgerten aus der Möglichkeit der gleichzeitigen Produktion sowohl des Wachstumsfaktors als auch der dazugehörigen Rezeptoren durch die Zelle, daß daraus eine "autocrine Stimulation" der Zellproliferation resultieren könnte. Bishop (9) klärte den Mechanismus der akuten Transformation von Zellkulturen durch Retroviren auf:

Die viralen onc-Gene konnten nur dann die Zelle transformieren, wenn ein viraler Promotor vorgeschaltet war. Durch die Rekombination nichtonkogener viraler Genome, die sich zufällig in der Nachbarschaft von zellulären "Onkogenen" befanden, wurden zum Teil replikationsdefekte Tumorviren produziert. Diese "akuten" Retroviren benötigen Helferviren für ihren Replikationszyklus, weil sie im Austausch für ihre eigenen Replikationsgene "irrtümlich" zelluläre "Onkogene" in ihr Capsid aufgenommen haben. Diese Entdeckung ließ für Bishop den Schluß zu (9), daß die viralen Onkogene nur von den zellulären Homologen abstammen können und nicht umgekehrt.

Blair et al. (11) bewiesen, daß die zellulären "Onkogene" nach geeigneter Aktivierung ebenfalls Zelltransformationen auslösen können. Dies gelang ihnen durch die Kopplung eines c-onc-Gens an einen viralen Promotor in vitro und anschließende Transfektion mit dieser rekombinanten DNA.

Neben einer akuten gibt es auch eine chronische Transformation durch Retroviren. Der Wirkungsmechanismus ist mit dem "Promotorinsertionsmodell" (43) gut zu erklären. Die Integration des Provirus in das zelluläre Genom erfolgt nach dem Zufallsprinzip, so daß es erst nach längerer Latenzzeit zu einer Insertion des viralen Promotor vor einem der wenigen potentiellen zellulären "Onkogene" kommt.

4.6.3. Leukämieinduktion durch 7,12 DMBA, möglicher Weg unter Berücksichtigung der Genproduktdosistheorie und des Promotorinsertionsmodells

Die virale Tumorgenese - besonders durch die "chronischen" Retroviren - wurde deshalb ausführlicher erläutert, weil sie Modellcharakter für die chemische Induzierung von Tumoren oder von leukämischen Erkrankungen haben könnte. Mit Hilfe des Promotorinsertionsmodells und der Genproduktdosistheorie kann man sich die Leukämieinduktion durch 7,12 DMBA, wie folgt, vorstellen:

Es wurde schon erwähnt, daß 7,12 DMBA gehäuft zu Chromosomenbrüchen und SCE's führt (74,76,98). Es ist denkbar, daß besonders nach Doppelstrangbrüchen der DNA durch Transloka-

tion zufällig ein zellulärer Promotor, der zuvor einem aktiveren Genom vorgeschaltet war, nun vor ein zelluläres "Onkogen" gesetzt wird. Die Folge wäre eine intrazelluläre Konzentrationssteigerung der durch das "Onkogen" codierten Reglerproteine. Dadurch wird die Ausdifferenzierung der Zelle blokkiert und andere Veränderungen in Gang gesetzt, die für eine transformierte Zelle charakteristisch sind.

Dieser hypothetische Verlauf der chemischen Cancerogenese wird durch die Beobachtungen von Shih et al. (90) untermauert. Sie transformierten NIH 3T3-Zellen durch DNA-Transfer aus chemisch transformierten Mauszellen erfolgreich. Auch Beispiele aus der Humanmedizin sprechen für die wichtige Rolle, die sowohl Chromosomenbrüche als auch Translokationen bei der Cancerogenese spielen:

Das Bloom-Syndrom (62), die Fanconi-Anämie und das Louis Bar-Syndrom (70) sind Krankheiten, die durch eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit und gleichzeitig durch ein gehäuftes Auftreten von Leukämien und malignen Lymphomen gekennzeichnet sind. Wie schon erwähnt, gibt es beim Burkitt-Lymphom des Menschen öfter eine reziproke 8;14-Translokation (60).

4.6.4. Endozelluläre Kontrolle von Zellproliferation und terminaler Differenzierung

Zwei Fragen werden durch das Promotorinsertionsmodell und die Genproduktdosistheorie nicht beantwortet:

1. In der ersten Phase der Leukämie kommt es zu einer reduzierten Proliferationstätigkeit (25,83), die durch beide Theorien nicht erklärt werden können. Im Verlaufe der chronischen 7,12 DMBA-Schädigung fiel der Proliferationsfaktor ebenfalls. Auch wurde die Verdopplungszeit länger.
2. Welche Faktoren sind für die retardierte und unvollständige Differenzierung der leukämischen Zellen verantwortlich?

Hinweise für die Mechanismen, die das Wechselspiel zwischen Proliferation und Differenzierung einer normalen Zelle kontrollieren, wurden durch v. Wangenheim (104) zunächst im

pflanzlichen Endosperm gefunden, dann durch strahlenbiologische Untersuchungen bei anderen pflanzlichen Organen und parallele Beobachtungen bei Tieren ergänzt. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der endozelluläre Kontrollmechanismus von Zellproliferation und terminaler Differenzierung auf drei Prinzipien (104) basiert:

1. Semiautonomie des Zytoplasmawachstums:
   Die Zytoplasmamenge, die während des Mitosezyklus gebildet wird, ist von der schon vorher vorhandenen Zytoplasmamenge und extrazellulären Faktoren abhängig.

2. Auslösung der folgenden Differenzierungsschritte durch Anstieg des Verhältnisses Zytoplasmamenge/im Kern befindlichem Genom:
   Wird durch extrazelluläre Faktoren eine Aufrechterhaltung oder Induktion der Mitoseaktivität nicht erzwungen, induziert eine allmähliche Zunahme der Zytoplasmamenge gegenüber der genetischen Kernsubstanz über eine bestimmte Schwelle hinaus in proliferierenden Zellen die Einleitung der folgenden Differenzierungsschritte. Der induzierende Faktor für die Differenzierung ist möglicherweise die mit dem Zytoplasma ansteigende mitochondriale Genommenge.

3. Unterbindung der Mitosetätigkeit durch terminale Differenzierung:
   Nach dem Durchlaufen intermediärer Differenzierungsschritte erreicht die Zellnachkommenschaft das Stadium der End-Differenzierung; dieses unterbindet die mitotische Aktivität.

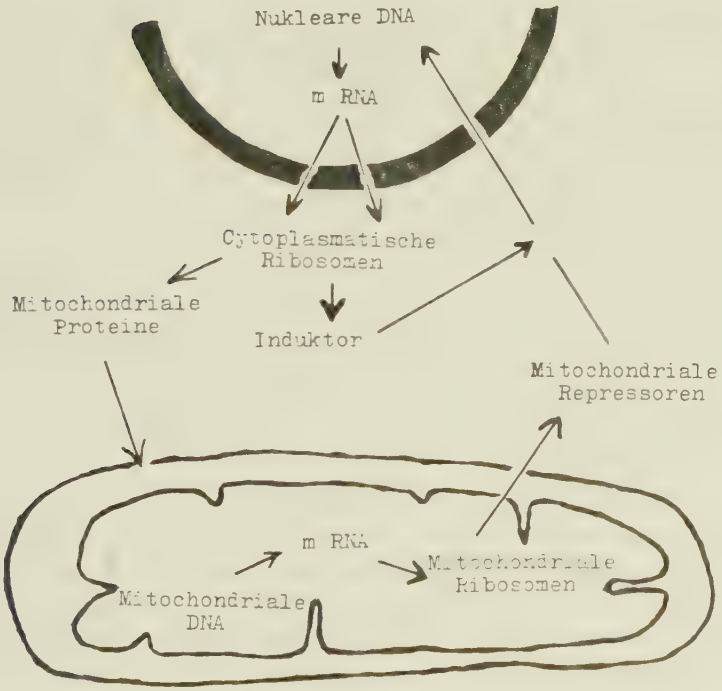
Unter anderem reagieren Zellen nach Röntgenbestrahlung mit einer vorübergehenden Hemmung der Mitosetätigkeit, während die nukleäre RNA-Synthese und Vermehrung des Zytoplasmas bzw. der Mitochondrien weiter ablaufen. Dies ist die Folge der höheren Strahlenresistenz des zytoplasmatischen Zellanteils gegenüber den strahlensensibleren Prozessen der Mitose. Durch diesen Zytoplasmazuwachs erreicht die Zelle die nächsten Dif-

ferenzierungs- bzw. Reifestadien früher und die Anzahl der mitotischen Zyklen, die die Zelle nach der Erholung des Zellkerns durchläuft, ist entweder reduziert, oder die Zelle tritt gar nicht mehr in die Mitose ein, wenn das terminale Differenzierungsstadium vorher erreicht wird. Dieser Vorgang wurde als "verzögerte" bzw. "unmittelbar verzögerte Ausdifferenzierung" bezeichnet. Ob bei einer Zelle die mitotische Aktivität durch "frühe Ausdifferenzierung" unmittelbar gebremst werden kann, hängt a) von ihrem Differenzierungstadium und b) von der Bestrahlungsdosis ab, die die Dauer der vorübergehenden Mitosehemmung und damit das Ausmaß des Zytoplasmazuwachses bestimmt.

Die Anzahl der Mitosezyklen, die die Zellnachkommenschaft zu durchlaufen hat, ist - entsprechend der Theorie (104) - sowohl von dem initialen Verhältnis der mitochondrialen Genome zur Anzahl der nuklearen Chromosomensätze als auch von der Zuwachsrate des Zytoplasmas während der Mitosezyklen abhängig. Grundlage zum Verständnis dieses Mechanismus ist ein Modell (104), das auf Untersuchungen von Barath und Küntzel (6) über die Koordination zwischen den Teilungszyklen des Zellkerns und der Mitochondrien bei Neurospora crassa zurückgeht. Vorauszuschicken ist, daß 90% der mitochondrialen Proteine durch nukleare Gene codiert und durch zytoplasmatische Ribosomen synthetisiert werden (6).

Die Autoren (6) fanden Hinweise, wonach die Kontrolle der korrespondierenden nukleären Cistrone durch ein oder mehrere Repressorproteine erfolgt, die wiederum durch mitochondriale DNA codiert und durch mitochondriale Ribosomen synthetisiert werden. Auf diese Weise können - entsprechend der Hypothese von Barath und Küntzel (6) - die Mitochondrien die Synthese der mitochondrialen Proteine und damit ihre eigene Anzahl limitieren. Es muß weiterhin angenommen werden (104), daß mitochondriale Repressorproteine auch die Biosynthese essentieller endozellulärer Enzyme regulieren, die z.B. bei der nukle-

ären DNA-Synthese und der Zelldifferenzierung eine zentrale Rolle spielen. So kann eine bestimmte Anzahl von Mitochondrien bzw. eine bestimmte Konzentration mitochondrialer Repressormoleküle die mitotische Aktivität unterdrücken und die Zelldifferenzierung in Gang setzen. Entsprechend dem Modell des endozellulären Kontrollmechanismus (104) codiert die nukleare DNA ebenfalls einen - wenn auch kurzlebigen - Induktor, der die terminale Differenzierung der Zelle durch Inaktivierung des mitochondrialen Repressormoleküls verhindert.



Modifiziert nach (104)

Die Menge des kurzlebigen Induktors ist von der durch die Ploidie der Zelle festgelegten Anzahl der nuklearen Allele abhängig. Wenn aufgrund der Vermehrung der mitochondrialen Genome die Anzahl der mitochondrialen Repressorproteine die der nuklearen Induktoren übersteigt, kommt es zur terminalen Differenzierung und Beendigung der Mitosetätigkeit. Die bei dem Modell (104) erwähnten Induktoren könnten durch die Einwirkung eines "Onkogen"-Produktes (wie z.B. die Proteinkinase pp60v-src, siehe Kapitel 4.6.2.) in einem erhöhten Maße produziert werden. Die Folge wäre eine Blockierung der terminalen Differenzierung der dann ausschließlich proliferierenden Zellen.

Eine für die Persistenz der durch DMBA ausgelösten Schäden bedeutsame Konsequenz der "vorzeitigen Ausdifferenzierung" ist folgende: Eine beschleunigte terminale Ausdifferenzierung kann auch durch Verlängerung der Mitosezykluszeit aufgrund chromosomaler Läsionen erfolgen. Je Mitosezyklus wird mehr Zytoplasma produziert und das zur Ausdifferenzierung benötigte Zytoplasmaniveau nach weniger Mitosezyklen als normal erreicht (105). Der gleiche Mechanismus könnte für die "vorzeitige Ausdifferenzierung" der zweiten Gruppe des Stammzell-Kompartiments (Kapitel 4.5.2.) nach der chronischen DMBA-Schädigung angenommen werden.

4.6.5. Zusammenfassendes Konzept der Leukämogenese durch 7,12 DMBA

Da 7,12 DMBA Chromosomenbrüche und SCE's auslöst (74,76, 98), ist wahrscheinlich, daß es ähnliche Effekte wie Röntgenbestrahlung erzielt: In der ersten Phase der Leukämie ist die Mitosetätigkeit und damit die Proliferationsaktivität reduziert. Für die unvollständige Differenzierung der leukämischen Zellen bestehen offenbar entsprechende Zusammenhänge:

1. Das Ausmaß der Zytoplasmazunahme je Mitosezyklus kann durch Mutation der nuklearen Cistrone, die die mitochondrialen Proteine und Enzyme codieren, oder durch Genomveränderungen innerhalb der Mitochondrien reduziert werden. Dadurch wird die Schwellenmenge des Zytoplasmas,

die für eine weitere Differenzierung notwendig ist, nicht erreicht. Die Zelle bleibt dann ständig mitotisch aktiv.

2. Aufgrund der DMBA-Einwirkung kommt es durch die Vorschaltung eines aktiveren Promotors zur Aktivierung eines zellulären "Onkogens". Die Folge wäre, daß die Konzentration phosphorylierter Reglerproteine in der Zelle sich erhöht, wodurch der hypothetische nukleare Induktor (104) vermehrt produziert und damit die terminale Differenzierung der proliferierenden Zellen verhindert würde. Gleichzeitig würde die Anzahl der Mitochondrien weiter erhöht, wodurch unter anderem auch die Onkozytome der Parotis und anderer Drüsen charakterisiert sind.

Es gibt gesicherte Hinweise, daß die Leukämie nicht durch eine beschleunigte Produktion pathologischer Zellen entsteht. Cronkite (25) schätzt aufgrund zellkinetischer Untersuchungen, daß 6.10^5 - $6 . 10^7$ leukämische Zellen pro Stunde produziert werden. Diese Produktionsrate liegt im Rahmen der Norm, wenn man die Zellproduktion eines normalen Stammzellpools zum Vergleich heranzieht (91): Hier werden $5,3.10^2$ Zellen/g Körpergewicht/Stunde gebildet. Bei einem 70 kg schweren Probanden wären das $3,71 . 10^7$/Stunde. Die leukämischen Blutbilder entstehen in umgekehrter Weise durch eine Akkumulation undifferenzierter, nicht mehr proliferierender Zellen. Aufgrund ihrer retardierten Differenzierung weisen sie eine verlängerte Aufenthaltsdauer in der peripheren Blutbahn auf (25): Die Halbwertszeit leukämischer Blasten im Blut bei einer akuten myeloischen Leukämie beträgt ungefähr 23 Stunden (normal: 6 - 8 Stunden).

Normale Zellen differenzieren nach Verlängerung der Mitosezykluszeit, die durch eine Schädigung induziert wurde, aufgrund chromosomaler Defekte aus (Mechanismus der "vorzeitigen Ausdifferenzierung") und verlassen das Knochenmark. Durch 7,12 DMBA wird besonders das Stammzell-Kompartiment geschädigt. Es ist möglich, daß als Folge dieser Einwirkung eine oder mehrere Stammzellen transformiert werden. Diese neoplastischen Zellen mit einem Zytoplasma-Vermehrungsdefekt bleiben auch nach bedeutender Verlängerung des Mitosezyklus

mitotisch aktiv, sind dadurch in der Lage, in weit stärkerem Maße genetisch zu variieren als normale Zellen (105), und eine Selektion auf erhöhte Malignität kann erfolgen. Es entsteht somit ein "unsterblicher" Klon im Knochenmark. Die proliferierende Nachkommenschaft dieses Klons verdrängt die normalen Knochenmark-Kompartimente, wodurch defiziente Infektabwehr, Anämie und Thrombozytopenie entstehen. Das Knochenmark verlassen in der frühen Leukämiephase hauptsächlich nichtproliferierende, unreife Zellen (83). Dabei ist aber nicht auszuschließen, daß vereinzelt auch proliferierende, leukämische Stammzellen die Knochenmark-Blut-Schranke durchbrechen, um in anderen Organen neue Zellabsiedlungen zu bilden. Das Überwinden dieser Schranke war auch für gesunde Stammzellen beschrieben worden (34). Es ist denkbar, daß beim Myeloblastenschub diese Schranke dann vollständig zusammenbricht und der Organismus in kurzer Zeit von großen Mengen pathologischer Zellen überschwemmt wird.

Subleukämische oder aleukämische Blutbilder könnten durch eine hohe Todesrate leukämischer Zellen am Bildungsort entstehen: Cronkite (25) spricht von einer inhärenten "death function" der leukämischen Zellen. Das resultierende klinische Bild einer Leukämie ist somit von vielen verschiedenen Parametern abhängig. Trotzdem weisen alle Leukämien eine gemeinsame Eigenschaft auf: Die leukämischen Zellen sind sowohl in ihrer Proliferationsfähigkeit als auch in ihrem Vermögen, vollständig auszudifferenzieren, mehr oder weniger stark gestört.

Der Stammzell-Qualitätstest könnte somit aufgrund von Veränderungen des Proliferationsfaktors die Malignität eines Stammzellpools und seiner proliferierenden Nachkommen zu einem Zeitpunkt erfassen, wo im peripheren Blutbild noch keine morphologischen Anzeichen einer Leukämie festzustellen sind.

5. Zusammenfassung

Einleitend wurden die verschiedenen DMBA-Wirkungen auf den Gesamtorganismus erwähnt. Im experimentellen Teil wurde bei C57 bl/6 J Mäusen die Änderung der Proliferationsaktivität der Knochenmark-Stammzelle und ihrer proliferierenden Nachkommenschaft im Verlaufe einer chronischen Schädigung durch bis zu insgesamt acht intraperitoneale 7,12 DMBA-Injektionen von je 1 mg mit Hilfe des Stammzell-Qualitätstests untersucht. Bei diesem Testverfahren werden drei bzw. fünf Tage nach der Transfusion syngener Knochenmarkszellen in letal bestrahlte Empfängermäuse die in den regenerierenden Milzen der Rezipienten befindlichen Stammzellen und ihre proliferierenden Nachkommen mit Hilfe von ^{125}IUdR (^{125}Jod-Desoxyuridin) markiert. ^{125}IUdR wird als Thymidinanalogon in die DNA von S-Phase-Zellen eingebaut. Die inkorporierte Radioaktivität ist dabei proportional zur Anzahl der proliferierenden Nachkommenschaft milzsiedelnder Stammzellen der behandelten Spender bzw. unbehandelten Kontrollen. Der Aktivitätszuwachs zwischen dem dritten und fünften Tag gibt als Proliferationsfaktor über die Proliferationsaktivität des Stammzell-Kompartiments und der proliferierenden Nachkommenschaft Auskunft.

Während drei Wochen nach einer DMBA-Applikation der Proliferationsfaktor auf 87,4% der Kontrolle (d.K.) fiel, war drei Wochen nach der vierten Cancerogengabe ein Rückgang auf 78,7% d.K. zu beobachten. Mit 77,4% d.K. blieb der Proliferationsfaktor drei Wochen nach der achten DMBA-Injektion nahezu auf gleicher Höhe, um sechs Wochen später anstelle der erwarteten Erholung eine weitere leichte Reduktion mit 75% d.K. zu erfahren.

Neben dem Stammzell-Qualitätstest wurde gleichzeitig der Milzkolonie-Test durchgeführt. Dabei fiel die Stammzellzahl (CFU-S/Femur) drei Wochen nach der ersten Applikation auf 79% d.K., nach 4 mg DMBA auf 53% d.K. und nach insgesamt 8 mg auf 58% d.K. (jeweils drei Wochen nach der letzten Cancerogengabe). Neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion erreichten die CFU-S/Femur mit 38% d.K. ihren niedrigsten Wert.

Durch den Proliferationsindex wurden CFU-S-Anzahl und inkorporierte Radioaktivität direkt zueinander in Beziehung gesetzt. Drei Wochen nach der vierten DMBA-Injektion waren die CFU-S stark reduziert, während die inkorporierte Radioaktivität im unteren Normbereich verblieb. Der dadurch erhöhte Proliferationsindex läßt auf eine Kompensation der stark geschädigten Stammzellqualität durch eine erhöhte Proliferationsleistung des Determinationsspeichers im Knochenmark schließen. Neun Wochen nach der achten DMBA-Injektion war die Erhöhung des Proliferationsindexes auf die starke CFU-S-Reduktion zurückzuführen, während die inkorporierte Radioaktivität auf ihrem niedrigen Niveau nahezu konstant blieb.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen Rückschlüsse auf die einleitenden zellbiologischen Veränderungen bei der Leukämogenese zu: Die Reduktion des Proliferationsfaktors steht mit Veröffentlichungen im Einklang, die bei leukämischen Zellen eine Verlängerung der Mitosezykluszeit festgestellt haben.

Es wurde die mögliche Entstehungsweise der durch 7,12 DMBA-induzierten Leukämie mit Hilfe der Genproduktdosistheorie, der Promotorinsertionshypothese und des Modells der endozellulären Kontrolle von Zellproliferation und terminaler Differenzierung erläutert.

Die leukämische Zelle ist durch eine reduzierte Proliferationsaktivität und einen Differenzierungsrückstand charakterisiert. Die fehlende Ausdifferenzierung bedingt die verlängerte Aufenthaltsdauer in der peripheren Blutbahn und damit das leukämische Blutbild.

C. Ergebnisse

Tabelle 13: Körpergewicht in Gramm im Verlauf der DMBA-Injektionen von jeweils 1 mg i.p. Die Applikationen erfolgten in der 0.,2.,4.,6., 8.,10.,12. und 14. Woche.
Es wurden Standardabweichungen zur Darstellung der Streuung der Einzelwerte vom Mittelwert angegeben. Die Gruppen bestanden aus jeweils 6 - 14 Tieren.

$\bar{x} \pm s$ = Mittelwert mit Standardabweichung

$\bar{x} \pm SE$ = Mittelwert mit Standardfehler

Zeitpunkt der Gewichtsmessung	Kontrolle Körpergewicht in Gramm	7,12 DMBA Körpergewicht in Gramm	% der Kontrolle
	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm SE$
0. Woche 1. DMBA-Injektion	21,36 ± 0,17 19,21 ± 0,14 23,33 ± 0,19 21,44 ± 0,20	21,66 ± 0,21 19,41 ± 0,11 23,35 ± 0,11 21,22 ± 0,12	100% ± 0,4%
1. Woche 1 Woche nach der ersten DMBA-Injek.	21,54 ± 0,21 19,98 ± 0,10 23,35 ± 0,11 21,82 ± 0,14	21,20 ± 0,15 19,34 ± 0,21 23,25 ± 0,15 21,40 ± 0,15	97% ± 0,3%
2. Woche 2. DMBA-Injektion	21,93 ± 0,22 20,71 ± 0,12 23,37 ± 0,12 21,96 ± 0,1[illegible]	21,57 ± 0,2[illegible] 20,[illegible] ± [illegible] 22,75 ± 0,[illegible] 21,61 ± 0,1[illegible]	95% ± 0,3%
3. Woche 1 Woche nach der zweiten DMBA-Inj.	22,50 ± 0,1[illegible] 21,51 ± 0,11 24,07 ± 0,11 22,56 ± 0,25	22,31 ± 0,1[illegible] 20,5[illegible] ± [illegible] 23,61 ± 0,1[illegible] 21,2[illegible] ± 0,14	[illegible]% ± 1,1%
4. Woche 3. DMBA-Injektion	22,01 ± 0,1[illegible] 23,[illegible] ± 0,0[illegible] 22,99 ± 0,19	[illegible],9[illegible] ± 0,1[illegible] 23,55 ± 0,[illegible] 21,71 ± 0,[illegible]	9[illegible]% ± 1,3%
5. Woche 1 Woche nach der dritten DMBA-Inj.	22,00 ± 0,12 24,19 ± 0,17 22,67 ± 0,19	20,55 ± 0,15 24,[illegible] ± 0,[illegible] 21,63 ± 0,24	95% ± 1,5%

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 13:

Zeitpunkt der Gewichtsmessung	Kontrolle Körpergewicht in Gramm	7,12 DMBA Körpergewicht in Gramm	% der Kontrolle
	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm SE$
6. Woche 4. DMBA-Injektion	22,74 ± 0,23 24,30 ± 0,13 23,10 ± 0,16	21,54 ± 0,12 24,60 ± 0,43 22,23 ± 0,09	97% ± 2,1%
7. Woche 1 Woche nach der vierten DMBA-Inj.	22,78 ± 0,14 24,41 ± 0,19 23,32 ± 0,27	21,92 ± 0,17 25,21 ± 0,66 22,39 ± 0,20	100% ± 3,5%
8. Woche 5. DMBA-Injektion	22,97 ± 0,14 23,93 ± 0,11 23,38 ± 0,32	21,43 ± 0,29 26,03 ± 0,58 22,49 ± 0,34	98% ± 2,9%
9. Woche 1 Woche nach der fünften DMBA-Inj.	23,29 ± 0,28 24,31 ± 0,09 22,59 ± 0,32	22,19 ± 0,58 26,16 ± 0,43 23,49 ± 0,25	102% ± 5,0%
10. Woche 6. DMBA-Injektion	23,37 ± 0,34 24,49 ± 0,15 24,19 ± 0,23	22,07 ± 0,92 27,35 ± 0,35 23,54 ± 0,49	103% ± 3,7%
11. Woche 1 Woche nach der sechsten DMBA-Inj.	23,38 ± 0,36 25,25 ± 0,25 24,00 ± 0,21	22,35 ± 0,91 27,46 ± 0,16 23,06 ± 0,37	105% ± 5,4%
12. Woche 7. DMBA-Injektion	23,38 ± 0,40 25,62 ± 0,03 23,81 ± 0,25	23,63 ± 0,39 30,21 ± 0,56 23,47 ± 0,47	104% ± 3,5%
13. Woche 1 Woche nach der siebten DMBA-Inj.	23,35 ± 0,21 24,39 ± 0,11 23,53 ± 0,25	24,74 ± 1,78 27,39 ± 1,44 24,43 ± 0,81	103% ± 3,3%
14. Woche 8. DMBA-Injektion	23,45 ± 0,16 25,46 ± 0,19 24,03 ± 0,25	24,42 ± 1,17 29,97 ± 1,33 25,16 ± 1,19	103% ± 1,5%
15. Woche 1 Woche nach der achten DMBA-Inj.	24,33 ± 0,22 25,04 ± 0,02 24,09 ± 0,27	24,02 ± 0,31 26,40 ± 0,92 23,19 ± 1,48	103% ± 3,1%
16. Woche 2 Wochen nach der achten DMBA-Inj.	24,52 ± 0,30 25,64 ± 0,32 24,29 ± 0,29	24,72 ± 0,78 27,99 ± 1,24 21,72 ± 0,94	100% ± 4,6%

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 13:

Zeitpunkt der Gewichtsmessung	Kontrolle Körpergewicht in Gramm	7,12 DMBA Körpergewicht in Gramm	% der Kontrolle
	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm SE$
17. Woche 3 Wochen nach der achten DMBA-Inj.	24,72 ± 0,39 25,28 ± 0,39 24,10 ± 0,22	25,43 ± 1,08 27,28 ± 1,73 21,56 ± 1,15	100% ± 4,8%
18. Woche 4 Wochen nach der achten DMBA-Inj.	23,71 ± 0,33 24,07 ± 0,21	23,43 ± 0,13 21,18 ± 1,76	90% ± 1,0%
19. Woche 5 Wochen nach der achten DMBA-Inj.	24,59 ± 0,34 24,40 ± 0,36	22,54 ± 0,97 18,95 ± 0,55	80% ± 1,0%
20. Woche 6 Wochen nach der achten DMBA-Inj.	24,59 ± 0,9? 24,32 ± 0,30	20,25 ± 0,10 18,18 ± 0,63	75% ± 0,7%
21. Woche 7 Wochen nach der achten DMBA-Inj.	25,11 ± 0,63 24,17 ± 0,36	18,72 ± 0,09 20,03 ± 1,83	79% ± 1,4%
22. Woche 8 Wochen nach der achten DMBA-Inj.	25,06 ± 0,63 23,73 ± 0,35	18,66 ± 0,54 20,53 ± 2,34	75% ± 8,5%

Tabelle 14a und b: Drei Wochen nach einer einmaligen 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Inkorporierte Radioaktivität der Empfängermilzen drei (Tab. 15a) und fünf (Tab. 15b) Tage nach Transfusion von 1,0 , 1,5 und 2,25x1 Mill. Spenderknochenmarkszellen in letal bestrahlte Recipienten. Die verschiedenen Transfusionsmengen (1,0 - 2,25x1 Mill.) und die dazugehörigen Radioaktivitäten wurden auf 1,0x1 Mill. transfundierte Zellen bezogen und als Mittelwerte ± SE dargestellt.

Tabelle 14a:

3 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					
Kontrolle $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x}$ ± SE	Gesamt-mittelwert	7,12 DMBA $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x}$ ± SE	Gesamt-mittelwert	% der Kontr.
1527 ± 129	1885 ± 118	2755 ± 243	2056 ± 232	1520 ± 87	1168 ± 183	2060 ± 204	1882 ± 151	1703 ± 254	1163 ± 8	77%
1128 ± 207	1215 ± 27	2598 ± 47	1647 ± 133		1148 ± 67	837 ± 78	790 ± 74	925 ± 103		
1682 ± 67	1487 ± 34	1223 ± 49	1464 ± 69		1499 ± 71	1249 ± 63	1142 ± 13	1297 ± 69		
920 ± 21	932 ± 22	887 ± 29	913 ± 34		756 ± 31	635 ± 54	788 ± 19	726 ± 49		

Tabelle 14b:

5 d	Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					Inkorporierte Radioaktivität pro $1 \cdot 10^6$ transfundierte Zellen (in cpm)					
Kontrolle $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	Kontrolle $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x}$ ± SE	Gesamt-mittel-wert	7,12 DMBA $1{,}0 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $1{,}5 \cdot 10^6$ tZ	7,12 DMBA $2{,}25 \cdot 10^6$ tZ	$\bar{x}$ ± SE	Gesamt-mittel-wert	% der Kontr.
47889 ± 4665	38581 ± 611	28506 ± 2519	38358 ± 3675	35757 ± 2807	42595 ± 2314	31535 ± 3258	27949 ± 1645	34026 ± 3404	24723 ± 1872	69%
42021 ± 1861	39660 ± 3593	41416 ± 1276	47699 ± 3173		27223 ± 1131	17285 ± 1004	22624 ± 1731	22377 ± 1850		
36846 ± 1060	35261 ± 1333	30342 ± 580	34150 ± 1401		29903 ± 1741	22873 ± 2094	24578 ± 1111	25785 ± 2332		
24698 ± 1209	23648 ± 1398	20119 ± 1145	22822 ± 1769		15462 ± 1128	18119 ± 962	16532 ± 424	16704 ± 446		

Tabelle 14c: Drei Wochen nach einer einmaligen 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Der Quotient aus der inkorporierten Radioaktivität am 5. Tag und der des 3. Tages, ergibt jeweils für jede der drei verschiedenen Zellkonzentrationen den Proliferationsfaktor. Die Werte der Kontrollgruppen wurden auf den Proliferationsfaktor $\bar{x}$ = 23,48 normalisiert und die entsprechenden Werte der Verumgruppen mit dem resultierenden Faktor multipliziert.

KONTROLLE				Durchschnittsfaktor	7,12 DMBA				
PF	$\bar{x} \pm SE$ PF	PF (normalisiert)	$\bar{x} \pm SE$ PF (normalisiert)		PF	$\bar{x} \pm SE$ PF	PF (normalisiert)	$\bar{x} \pm SE$ PF (normalisiert)	% der Kontr.
10,35		11,72			15,30		17,32		
20,46	20,75 ±	23,16	23,48 ±	1,1321	14,85	22,21 ±	16,81	25,14 ±	107%
31,43	3,52	35,48	3,99		36,47	4,12	41,29	4,66	
15,94		11,15			28,61		20,01		
47,55	33,58 ±	33,25	23,48 ±	0,6992	20,66	24,13 ±	14,45	17,01 ±	72%
37,25	5,38	26,05	3,76		23,71	1,34	16,58	0,94	
24,82		24,82			21,53		21,53		
23,72	23,48 ±	23,72	23,48 ±	1,0000	18,32	19,93 ±	18,32	19,93 ±	85%
21,91	0,49	21,91	0,49		19,95	0,54	19,95	0,54	
22,69		21,34			20,97		19,72		
25,36	24,97 ±	23,85	23,48 ±	0,9403	28,55	23,32 ±	26,85	21,93 ±	93%
26,85	0,71	25,25	0,67		20,45	1,51	19,23	1,42	

Statistische Auswertung

Drei Wochen nach einer 7,12 DMBA - Injektion i.p.

Gesamtmittelwerte der Proliferationsfaktoren		
Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle
25,69 ± 1,40	22,45 ± 0,89	87,4%

Wilcoxon,Mann,Whitney - Test (Rangfolgentest)

$U_1 = 144 + 78 - 179 = 43$

$U_2 = 144 + 78 - 121 = 101$

H_0 - Hypothese: $\mu_1 = \mu_2$, wenn $U_1 \leq U_0$ $(1,m,\alpha=0,05)$

$U_0\ (12;12;\ 0,05) = 37$ $\qquad$ $U_0 < U_1 = 43$

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Verumgruppe auf dem 5% - Niveau.

Statistische Auswertung

Drei Wochen nach der vierten 7,12 DMBA - Injektion i.p.

Gesamtmittelwerte der Proliferationsfaktoren		
Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle
[illegible] ± 0,75	[illegible] ± 0,71	78,7%

Wilcoxon,Mann,Whitney - Test (Rangfolgentest)

$U_1 = 81 + 45 - 110 = 16$

$U_2 = 81 + 45 - 61 = 65$

. H_0 - Hypothese: $\mu_1 = \mu_2$, wenn $U_1 \leq U_0$ $(1,m,\alpha=0,05)$

$U_0\ (9;9;\ 0,05) = 17$ $\qquad$ $U_0 > U_1 = 16$

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Verumgruppe auf dem 5% - Niveau. 7,12 DMBA reduziert statistisch signifikant nach einer Dosis insgesamt 4 mg den Proliferationsfaktor.

Statistische Auswertung

Drei Wochen nach der achten 7,12 DMBA - Injektion i.p.

Gesamtmittelwerte der Proliferationsfaktoren		
Kontrolle	7,12 DMBA	% der Kontrolle
19,39 ± 0,56	15,00 ± 0,86	77,4%

Wilcoxon,Mann,Whitney - Test (Rangfolgentest)

$U_1 = 81 + 45 - 112 = 14$

$U_2 = 81 + 45 - 59 = 67$

H_o - Hypothese: $\mu_1 = \mu_2$, wenn $U_1 \leq U_o$ $(1,m,\alpha=0,02)$

$U_o\ (9;9;\ 0,02) = 14$ $\qquad$ $U_o \geq U_1 = 14$

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Verumgruppe auf dem 2% - Niveau. 7,12 DMBA reduziert statistisch signifikant nach einer Dosis von insgesamt 8 mg den Proliferationsfaktor.

Tabelle 15 und b: Drei, neun und fünfzehn Wochen nach einer einmaligen 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Proliferationsindex: Relation zwischen der inkorporierten Radioaktivität der Empfängermilzen am dritten (Tab. 16a) bzw. fünften (Tab. 16b) Tag nach der Transfusion der Spenderknochenmarkszellen und den CFU-S am siebten Tag nach der Transfusion

$$\text{Proliferationsindex} = \frac{\text{cpm}/1 \cdot 10^6 \text{ tZ}}{\text{CFU-S}/1 \cdot 10^6 \text{ tZ}}$$

Tabelle 15a:

3 d	Kontrolle			7,12 DMBA			
	cpm/1·10⁶ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/1·10⁶tZ $\bar{x} \pm$ SE	cpm/1·10⁶ tZ / CFU-S/1·10⁶tZ	cpm/1·10⁶ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/1·10⁶tZ $\bar{x} \pm$ SE	cpm/1·10⁶ tZ / CFU-S/1·10⁶tZ	% der Kontr.
3 Wochen nach einer DMBA-Injek.	1520 ± 101	153 ± 3	9,9 ± 1,1	1163 ± 9	138 ± 19	8,4 ± 1,0	85%
9 Wochen nach einer DMBA-Injek.	1220 ± 117	108 ± 29	11,3 ± 2,9	1150 ± 8	111 ± 13	10,4 ± 0,4	92%
15Wochen nach einer DMBA-Injek.	1312 ± 62	132 ± 19	9,9 ± 0,8	1534 ± 75	125 ± 13	12,3 ± 1,9	124%

Tabelle 15b:

5 d	Kontrolle			7,12 DMBA			
	cpm/1·10⁶ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/1·10⁶tZ $\bar{x} \pm$ SE	cpm/1·10⁶ tZ / CFU-S/1·10⁶tZ	cpm/1·10⁶ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/1·10⁶tZ $\bar{x} \pm$ SE	cpm/1·10⁶ tZ / CFU-S/1·10⁶tZ	% der Kontr.
3 Wochen nach einer DMBA-Injek.	35758 ± 1651	153 ± 3	214,2 ± 17	24719 ± 1178	138,1 ± 1,9	178,0 ± 12	83%
9 Wochen nach einer DMBA-Injek.	24930 ± 1593	108 ± 29	212,0 ± 36	24890 ± 1876	111,0 ± 13	224,0 ± 41	97%
15 Wochen nach einer DMBA-Injek.	37069 ± 2098	132 ± 19	280,0 ± 39	37182 ± 1927	125,0 ± 13	298,0 ± 38	106%

Tabelle 16a und b: Drei Wochen nach der vierten 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Proliferationsindex: Relation zwischen der inkorporierten Radioaktivität der Empfängermilzen am dritten (Tab. 17a) bzw. fünften Tag (Tab. 17b) nach der Transfusion der Spenderknochenmarkszellen und den CFU-S am siebten Tag nach der Transfusion

Tabelle 16a:

3 d	Kontrolle			7,12 DMBA			
	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/$1 \cdot 10^6$tZ $\bar{x} \pm$ SE	$\frac{\text{cpm}/1 \cdot 10^6 \text{ tZ}}{\text{CFU-S}/1 \cdot 10^6 \text{tZ}}$	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/$1 \cdot 10^6$tZ $\bar{x} \pm$ SE	$\frac{\text{cpm}/1 \cdot 10^6 \text{ tZ}}{\text{CFU-S}/1 \cdot 10^6 \text{tZ}}$	% der Kontr.
	997 ± 87	162 ± 23	6,4 ± 0,5	1066 ± 98	68 ± 2,9	15,8 ± 1,2	247%

Tabelle 16b:

5 d	Kontrolle			7,12 DMBA			
	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/$1 \cdot 10^6$tZ $\bar{x} \pm$ SE	$\frac{\text{cpm}/1 \cdot 10^6 \text{ tZ}}{\text{CFU-S}/1 \cdot 10^6 \text{tZ}}$	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/$1 \cdot 10^6$tZ $\bar{x} \pm$ SE	$\frac{\text{cpm}/1 \cdot 10^6 \text{ tZ}}{\text{CFU-S}/1 \cdot 10^6 \text{tZ}}$	% der Kontr.
	17707 ± 2296	162 ± 23	111,6 ± 8,7	14626 ± 1744	68 ± 2,9	213,3 ± 11,3	191%

Tabelle 17a und b: Drei Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Proliferationsindex: Relation zwischen der inkorporierten Radioaktivität der Empfängermilzen am dritten (Tab. 18a) bzw. fünften (Tab. 18b) Tag nach der Transfusion der Spenderknochenmarkszellen und den CFU-S am siebten Tag nach der Transfusion.

Tabelle 17a:

3 d	K o n t r o l l e			7,12 D M B A			
	cpm/1·10^6 tZ $\bar{x}$ ± SE	CFU-S/1·10^{6}tZ $\bar{x}$ ± SE	cpm/1·10^6 tZ CFU-S/1·10^{6}tZ	cpm/1·10^6 tZ $\bar{x}$ ± SE	CFU-S/1·10^{6}tZ $\bar{x}$ ± SE	cpm/1·10^6 tZ CFU-S/1·10^{6}tZ	% der Kontr.
	1232 ± 36	176 ± 31	7,0 ± 0,6	921 ± 136	100 ± 20	9,0 ± 0,6	134%

Tabelle 17b:

5 d	K o n t r o l l e			7,12 D M B A			
	cpm/1·10^6 tZ $\bar{x}$ ± SE	CFU-S/1·10^{6}tZ $\bar{x}$ ± S	cpm/1·10^6 tZ CFU-S/1·10^{6}tZ	cpm/1·10^6 tZ $\bar{x}$ ± SE	CFU-S/1·10^{6}tZ $\bar{x}$ ± SE	cpm/1·10^6 tZ CFU-S/1·10^{6}tZ	% der Kontr.
	23345 ± 2616	176 ± 31	138,3 ± 10,3	13890 ± 2088	100 ± 20	142,2 ± 5,7	103%

Tabelle 18a und b: Neun Wochen nach der achten 7,12 DMBA-Injektion der Spender. Proliferationsindex: Relation zwischen der inkorporierten Radioaktivität der Empfängermilzen am dritten (Tab. 19a) bzw. fünften (Tab. 19b) Tag nach der Transfusion der Spenderknochenmarkszellen und den CFU-S am siebten Tag nach der Transfusion.

Tabelle 18a:

3 d	Kontrolle			7,12 DMBA			
	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ / CFU-S/$1 \cdot 10^6$ tZ	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ / CFU-S/$1 \cdot 10^6$ tZ	% der Kontr.
	1244 ± 31	212 ± 11	6,0 ± 0,3	986 ± 53	66 ± 4,6	15,0 ± 0,3	255%

Tabelle 18b:

5 d	Kontrolle			7,12 DMBA			
	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ / CFU-S/$1 \cdot 10^6$ tZ	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	CFU-S/$1 \cdot 10^6$ tZ $\bar{x} \pm$ SE	cpm/$1 \cdot 10^6$ tZ / CFU-S/$1 \cdot 10^6$ tZ	% der Kontr.
	25779 ± 4088	212 ± 11	122,0 ± 19,1	15012 ± 646	66 ± 4,6	228,0 ± 9,8	187%

Tabelle 19a und b: Normalisierter Proliferationsindex drei Wochen nach einer, vier und acht 7,12 DMBA-Injektionen bzw. neun Wochen nach acht 7,12 DMBA-Injektionen i.p.
Der Normbereich des Proliferationsindexes liegt am dritten Tag nach der Transfusion bei $\bar{x}$ = 7,3 ± 0,8 (Tab. 20a) und am fünften Tag nach der Transfusion bei $\bar{x}$ = 147,6 ± 21,0 (Tab. 20b)

Tabelle 19a:

3 d	K o n t r o l l e		Umrechnungsfaktor	7,12 D M B A	
Anzahl & Zeit 7,12 DMBA-Injektionen	PI $\bar{x}$ ± SE	PI (normalisiert)		PI $\bar{x}$ ± SE	PI (normalisiert)
3 Wochen nach einer DMBA-Injekt.	9,9 ± 1,1	7,3 ± 0,8	0,7373	8,4 ± 1,0	6,1 ± 0,7
3 Wochen nach der vierten DMBA-Injekt.	6,4 ± 0,5	7,3 ± 0,8	1,1406	15,8 ± 1,2	18,0 ± 1,4
3 Wochen nach der achten DMBA-Injekt.	7,1 ± 0,6	7,3 ± 0,8	1,0282	9,5 ± 0,6	9,8 ± 0,6
9 Wochen nach der achten DMBA-Injekt.	6,0 ± 0,3	7,3 ± 0,8	1,2166	15,0 ± 0,3	18,3 ± 0,4

Tabelle 19b:

5 d	K o n t r o l l e		Umrechnungsfaktor	7,12 D M B A	
Anzahl & Zeit 7,12 DMBA-Injektionen	PI $\bar{x}$ ± SE	PI (normalisiert)		PI $\bar{x}$ ± SE	PI (normalisiert)
3 Wochen nach einer DMBA-Injekt.	214,2 ± 17,3	147,6 ± 21,0	0,6891	75,0 ± 10,0	123,0 ± 8,3
3 Wochen nach der vierten DMBA-Injekt.	111,6 ± 6,7	147,6 ± 21,0	1,3226	213,3 ± 11,3	282,0 ± 14,9
3 Wochen nach der achten DMBA-Injekt.	138,3 ± 10,3	147,6 ± 21,0	1,0672	142,2 ± 5,7	152,0 ± 6,1
9 Wochen nach der achten DMBA-Injekt.	122,0 ± 19,1	147,6 ± 21,0	1,2100	228,0 ± 9,8	276,0 ± 11,9

7. Literaturverzeichnis

(1) Ahmed F.E., Gentil A., Rosenstein B.S. und Setlow R.B.: DNA - excision repair in human cells treated with ultraviolet radiation and 7,12 dimethylbenzanthracene-5,6-oxide. "Biochemica et Biophysica Acta" 608 (1980) pp. 154-166

(2) Albert R.E., Vanderlaan M., Burna F.J. und Nishizumi M.: Effect of carcinogens on chicken atherosclerosis. "Cancer Research" 37 (1977) pp. 2232-2235

(3) Alfred L.J. und Gelboin H.V.: Induction of benzpyrene hydroxylase by polycyclic hydrocarbons in hamster embryo cells grown in vitro. "Science" 157 (1967) pp. 75-77

(4) Alfred L.J. und DiPaolo A.: Reversible inhibition of DNA synthesis in hamster embryo cells in culture: Action of 1,2 benzanthracene and 7,12 dimethylbenzanthracene. "Cancer Research" 28 (1968) pp. 60-65

(5a) Baird W., Harvey R.G. und Brookes P.: Comparison of the cellular DNA bound products of benzopyrene with the products formed by the reaction of benzopyrene-4,5-oxide with DNA. "Cancer Research" 35 (1975) pp. 54-57

(5b) Baird W., Dipple A., Grover P., Sims P., und Brookes P.: Studies on the formation of hydrocarbon desoxyribonucleosid products by the binding of derivates of 7 methylbenzanthracene to DNA in aqueous solution and in mouse embryo cells in culture. "Cancer Research" 33 (1973) pp. 2386-2392

(6) Barath Z. und Küntzel H.: Cooperation of mitochondrial and nuclear genes specifying the mitochondrial genetic apparatus in Neurospora crassa. "Proceedings National Academic Science USA" 69 (1972) pp. 1371-1374

(7) Beilsteins Handbuch der organischen Chemie. 3. Ergänzungswerk Band 5, 4. Teil p. 2413, Springer Verlag, 1965

(8) Bishop J.M., Barker B., Fujita D., McCombe P., Sheiness D., Smith K., Spector D.H., Stehelin D., Varmus H.E.: Genesis of a virus - transforming gene. "National Cancer Institutes Monographie" 48 (1978) pp. 219-223

(9) Bishop J.M.: Enemies within: The genesis of retrovirus oncogenes. "Cell" 23 (1981) pp. 5-6

(10) Blackburn G.M., Plavell A.J., Orgee L., Will J.P. und Williams G.M.: The preparation of some specifically Tritium labelled carcinogenic hydrocarbons and their covalent binding to DNA. "Journal Chemical Society Perkin I" (1981) pp. 3196-3204

(11) Blair D.G., McClements W.L., Oskarsson M.K., Fischinger, P.J., Vande Woude G.F.: Biological activity of cloned Moloney Sarcoma Virus DNA. Terminally redundant sequences may enhance transformation efficiency. "Proceedings National Academic Science USA" 77 (1980) pp. 3504-3508

(12) Blobstein St.H., Weinstein J.D., Grunberger D., Weisgras, J. und Harvey R.G.: Products obtained after in vitro reaction of 7,12 dimethylbenzanthracene-5,6-oxide with nucleic acids. "Biochemistry" Vol 14 No 15 (1975) pp. 3451-3458

(13) Bloomer W.D. und Adelstein S.J.: Jodine-125-cytotoxicity. Implications for therapy and estimation of radiation risk. "International Journal of Nuclear Medicine and Biology". Vol 8 (1981) pp. 171-178

(14) Booth J., Keysell G.R. und Sims P.: Formation of gluthathion conjugates as metabolites of 7,12 dimethylbenzanthracene by rat liver homogenates. "Biochemical Pharmacology" 22 (1973) pp. 1781-1791

(15) Booth J., Keysell G.R. und Sims P.: Effect of oestradiol on the in vitro metabolism of 7,12 dimethylbenzanthracene and its hydroxymethyl derivatives. "Biochemical Pharmacology" 23 (1974) pp. 735-744

(16) Bowden G.T., Slaga T.J., Shapas B.G. und Boutwell R.K.: The role of aryl-hydrocarbon-hydroxylase in skin tumor initiation by 7,12 DMBA and 1,2,5,6 dibenzanthracene using DNA binding and Thymidine H-3-incorporation into DNA as criteria. "Cancer Research" 34 (1974) pp. 2634-2642

(17) Boyland E., Sims P. und Huggins C.: Induction of adrenal damage and cancer with metabolites of 7,12 DMBA "Nature" 207 (1965) pp. 816-817

(18) Brookes P. und Lawley P.D.: Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: Relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to desoxyribonucleic acid. "Nature" 202 (1964) pp. 781-784

(19) Brookes P. und Heidelberger Ch.: Isolation and degradation of DNA from cells treated with Tritium labeled 7,12 dimethylbenzanthracene: Studies on the nature of the binding of this carcinogen to DNA. "Cancer Research" 29 (1969) pp. 157-165

(20) Cawein H.J. und Sydnor K.L.: Suppression of cellular activity in the reticuloendothelial system of the rat by 7,12 dimethylbenzanthracene. "Cancer Research" 28 (1968) pp. 320-327

(21) Chen J.H.: Expression of endogenous Avian Myeloblastosis Virus information in different chicken cells. "Journal of Virology" 36 (198) pp. 162-170

(22) Chou M.W. und Yang S.K.: Identification of four trans-3,4-dihydriol metabolites of 7,12 dimethylbenzanthracene and their in vitro DNA-binding activities upon further metabolism. "Proceedings National Academic Science USA" 75 (1978) pp. 5466-5470

(23) Chou M.W., Yang S.K., Sydor W. und Yang C.S.: Metabolism of 7,12 dimethylbenzanthracene and 7-hydroxy-methyl-12-methylbenzanthracene by rat liver nuclei and microsomes. "Cancer Research" 41 (1981) pp. 1559-1564

(24) Cook J.W., Hewett C.L. und Hieger I.: The isolation of a cancer producing hydrocarbon from coal tar. Part I, II and III. "Journal Chemical Society" (1933) pp. 395-405

(25) Cronkite E.P.: Leukemia revisited. "Blood Cells" Vol 7 (1981) pp. 11-30

(26) Currie A.R., Bird C.C., Crawford A.M. und Sims, P.".: Embryopathic effect of 7,12 dimethylbenzanthracene and its hydroxymethyl derivatives in the Sprague - Dawley rat. "Nature" Vol 226 (1970) pp. 911-914

(27) Dao T.L.: The role of ovarian hormones in initiating the induction of mammary cancer in rats by polynuclear hydrocarbons. "Cancer Research" 22 (1962) pp. 973-981

(28) Dao T.L.: Some considerations on molecular structures of polynuclear hydrocarbons and inhibition of adrenal necrosis in rats. "Cancer Research" 24 (1964) pp. 1238-1242

(29) Dao T.L. und Sinha D.K.: Mammary adenocarcinoma induced in organ culture by 7,12 DMBA. "Journal National Cancer Institutes" 49 (1972) pp. 591-593

(30) Daniel F.B., Cazer F.D., Miambrosio S., Hart R.W., Kim W.H. und Witiak D.T.: Comparative metabolism and DNA-binding of 7,12 dimethylbenzanthracene and its weakly carcinogenic 5-Fluoroanalog. "Cancer Letters" 6 (1979) pp. 263-272

(31) Digiovanni J., Berry D.L., Slaga T.J., Jones A.H. und Juchau M.R.: Effect of pretreatment with 2,3,7,8 tetrachlordibenzo-p-dioxin on the capacity of hepatic and extrahepatic mouse tissues to convert procarcinogens to mutagens for Salmonella typhimurium auxotrophs. "Toxicologic appl. Pharmacology" 50(2) (1979) pp. 229-239

(32) Digiovanni J., Berry D.L., Slaga T.J. und Juchau M.R.: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (P.W. Jones und P. Leber eds.) Ann. Arbor Science, Ann Arbor, Michigan 1979 pp. 553-568

(33) DiGiovanni und Juchau M.R.: Biotransformation and bioactivation of 7,12 dimethylbenzanthracene. "Drug Metabolism Reviews" 11(1) (1980) pp. 61-101

(34) Douer D., Fabian I. und Cline M.J.: Circulating pluripotent haemopoietic cells in patients with myeloproliferative disorders. "British Journal of Haematology" 54 (1983) pp. 373-381

(35) Ek B., Westmark B., Wasterson A., und Heldin C.H.: Stimulation of Tyrosine specific phosphorylation by platlet-derived-growth-factor. "Nature" 295 (1982) pp. 419-420

(36) Erikson R.I., Collet M.S., Erikson E., Purchio A.F. und Brugge J.S.: Protein phosphorylation mediated by partially purified Avian Sarcoma Virus - transforming gene product. "Cold Spring Harbor Symposion Quant. Biology" 44 (Ptz) (1980) pp. 907-913

(37) Feuer G. und Kellen J.A.: Inhibition and enhancement of mammary tumorigenesis by 7,12 DMBA in the female Sprague-dawley rat. "International Journal Clinical Pharmacology" 9 (1974) pp. 62-69

(38) Flesher J.W., Harvey R.G. and Sydnor K.L.: Oncogenicity of K-region-epoxides of benzpyrene and 7,12 dimethylbenz-anthracene. "International Journal Cancer" 18 (1976) pp. 351-353

(39) Frindel E., Tubiana M. und Vassort F.: Generation cycle of mouse bone marrow. "Nature" Vol 214 No 5092 (1967) pp. 1017-1018

(40) Gelboin H.V., Wiebel F. und Diamond L.: Dimethylbenzanthracene tumorigenesis and aryl hydrocarbon hydroxylase in mouse skin: Inhibition by 7,8 benzoflavone. "Science" 170 (1970) pp. 169-171

(41) Glusker J.P., Zacharias D.E. und Carrell H.L.: Molecular structures of the chemical carcinogens 7-chlormethylbenz-anthracene and 7-chlormethyl-12-methylbenzanthracene. "Cancer Research" 36 (1976) pp. 2428-2435

(42) Harris C.C., Antrup H., Stoner G., Yang S.K., Leutz J.C., Gelboin H.V., Selkirk J.K., Connor R.J., Barrett L.A., Jones R.T., McDowell E. und Trump B.F.: Metabolism of benzpyrene and 7,12 DMBA in cultured human bronchus and pancreatic duct. "Cancer Research" 37 (1977) pp. 3349-3355

(43) Hayward W.S., Neel B.G., Astrin S.M.: Activation of a cellular onc-gene by promoter insertion in ALV induced lymphoid leukosis. "Nature" 290 (1981) pp. 475-480

(44) Heldin C.H., Westermark B. und Wasteson A.: Specific receptors for platelet-derived-growth-factor on cells derived from connective tissue and glia. "Proceedings National Academic Science USA" 78 (1981) pp. 3664-3668

(45) Hennings H., Smith H.C., Colburn N.H. und Boutwell R.K.: Inhibition by actinomycin D of DNA and RNA synthesis and of skin carcinogenesis initiated by 7,12 dimethylanthracene or β-propiolactone. "Cancer Research" 28 (1968) pp. 543-552

(46) Heuson J.C., Waelbroek C., Legros N., Gallez G., Robyn C. und L'Hermite: Inhibition of DMBA induced mammary carcinogenesis in the rat by 2Br-alpha-ergocryptine (CB-154), an inhibitor of prolactin secretion and by nafoxidine (U-11, 100A), an oestrogen antagonist. "Gynecological Investigation" 2 (1971) pp. 130-137

(47a) Hübner G.E., Wangenheim K.H.v. und Feinendegen L.E.: An assay for the measurement of residual damage of murine hematopoietic stem cells. "Experimental Hematology" Vol 9 No 2 (1981) pp. 111-117

(47b) Hübner G.E. und Cronkite E.P.: Drug-induced residual damage of murine hematopoietic stem cells measured by a new assay. "Leukemia Research" Vol 6 No 6 (1982) pp. 815-818

(48) Huggins C.B. und Sugiyama T.: Induction of leukemia in rat by puls doses of 7,12 dimethylbenzanthracene. "Proceedings National Academic Science USA" 55 (1966) pp. 74-81

(49) Hunter T., Sefton B.M. und Beemon K.: Relationship of polypeptide products of the transforming gene of Rous Sarcoma Virus and the homologous gene of vertebrates. "Proceedings National Academic Science USA" 77 (1980) pp. 2059-2063

(50) Hynes R.O.: Cellular location of viral transforming proteins "Cell" 21 (1980) pp. 601-602

(51) Jawetz E., Melnick J.L. und Adelberg E.A.: Medizinische Mikrobiologie. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1980 p. 446

(52) Jeffrey M., Blobstein S.H., Weinstein I.B., Beland F.A., Harvey R.G. und Kasai H.: Structure of 7,12 dimethylbenzanthracene-guanosine-adducts. "Proceedings National Academic Science USA" 73 (1976) pp. 2311-2315

(53) Jellinck P.H., Coles S. und Garland H.: Comparative metabolism of DMBA-12-14C in vitro. "Biochemical Pharmacology" 16 (1967) pp. 2449-2451

(54) Jerina D.M. und Daly J.W.: Arene oxides: A new aspect of drug metabolism. "Science" 185 (1974) pp. 573-582

(55) Jones D.W. und Sowden J.M.: Shapes of carcinogenic benzanthracenes: An x-ray-crystal structure analysis of 12-methylbenzanthracene. "Cancer Biochemical and Biophysics" 1 (1976) pp. 281-288

(56) Joyce N.J. und Daniel F.B.: 7,12 dimethylbenzanthracene-desoxyribonucleoside-adduct-formation in vivo: Evidence for the formation and binding of monohydroxymethyl-DMBA-metabolite to rat liver DNA. "Carcinogenesis" 3 (1982) pp. 297-301

(57) Kesteren A.C. van - van Leeuwen und Natarajan A.T.: Localisation of 7,12 dimethylbenzanthracene induced chromatid breaks and sister chromatid exchanges in chromosomes 1 and 2 of bone marrow cells of rat in vivo. "Chromosoma" (Berlin) 81 (1980) pp. 473-481

(58) Khanduja K.L., Dogra S.C. und Sharma R.R.: Glucuronic acid conjugates of metabolites of 7,12 dimethylbenzanthracen excreted through bile ducts in rat. "Indian Journal of Experimental Biology" Vol 19 (1981) pp 375-378

(59) Kleihues P., Doerjer G., Ehret M. und Guzman J.: Reaction of benzpyrene and 7,12 dimethylbenzanthracene with DNA of various rat tissues in vivo. "Archives Toxicol. Supplements" 3 (1980) pp. 237-246

(60) Klein G.: The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. "Nature" 294 (1981) pp. 313-318

(61) Korn A.P., Henkelman R.M., Ottensmeyer F.P. und Till J.E.: Investigations of a stochastic model of haemapoiesis. "Experimental Hematology" 1 (1973) p. 362

(62) Krämmer G.: Entsteht Krebs durch die Aktivierung zelleigener Gene? "Biologie unserer Zeit" 5 (1982) pp. 145-153

(63) Lahiri S.K., Keizer H.J. und van Putten L.M.: The efficiency of the assay for haemopoietic colony forming cells. "Cell Tissue Kinetics" Vol 3 No 4 (1970) pp. 355-362

(64) Levinson A.D., Opperman H., Varmus H.E. und Bishop J.M.: The purified product of the transforming gene Avian Sarcoma Virus phosphorylates tyrosine. "Journal Biological Chemistry" 255 (1980) pp. 11973-11980

(65) Magli M.C., Iscove N.N. und Odartchenko N.: Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. "Nature" 295 (1982) pp. 527-529

(66) Marquardt H., Baker S., Tierney B., Grover P.L. und Sims P.: Induction of malignant transformation and mutagenesis by dihydriols derived from 7,12 dimethylbenzanthracene. "Biochemical and Biophysical Research Communications" Vol 85 No 1 (1978) pp. 357-362

(67) McCaustland D.J., Fischer D.L., Kolwyck K.C., Duncan W.P., Wiley J.C. Jr., Menon C.S., Engel J.F., Selkirk J.K. und Roller P.P.: Carcinogenesis: Polynuclear aromatic hydrocarbons (R. Freudenthal and P.W. Jones, eds.) Vol 1, Raven New York 1976 pp. 349-412

(68) Miller E.C. und Miller J.A.: Molecular Biology of Cancer (H. Bush ed.) Academic Press New York NY 1974 pp. 377-402

(69) Moshel R.C., Baird W.M. und Dipple A.: Metabolic activation of the carcinogen 7,12 dimethyl-benzanthracene for the DNA binding. "Biochemical and Biophysical Research Communications" 76 (1977) pp. 1092-1098

(70) Murken J.D. und Cleve H.: Humangenetik (erschienen i.d. Enke-Reihe z. AO) 2. Aufl. (1979) pp. 63-64

(71) Newman M.S.: Carcinogenesis: Polynuclear aromatic hydrocarbons (R. Freudenthal and P.W. Jones, eds.) Vol 1, Raven New York (1976) pp. 203-208

(71a) Nishizuka Y. und Shisa H.: Enhancement of 7,12 DMBA leukämogenesis in mice by neonatal injection of cortisone-acetate. "British Journal of Cancer" 22 (1968) pp. 290-295

(72) Ogawa M., Porter P.N. und Nakahata T.: Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (an interpretive review) "Blood" Vol 61 no 5 (1983) pp. 823-829

(73) Oski F.A., Naiman J.L. und Diamond L.K.: Use of the plasma acid phosphatase value in the differentiation of thrombozytopenie states. "New English Journal Medicine" 268 (1963) pp. 1423-1430

(74) Pal K., Grover P.L. und Sims P.: The induction of sister chromatid exchanges by dihydrodiols derived from 7,12 dimethylbenzanthracene and 3 methylcholanthrene. "Cancer Letters" 7 (1979) pp. 45-49

(75) Palmer W.G., Allen T.J. und Tomaszewski J.E.: Metabolism of 7,12 DMBA by macrophages and uptake of makrophage-derived metabolites by respiratory tissues in vitro. "Cancer Research" 38 (1978) pp. 1079-1084

(76) Perry P. und Wolff S.: New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. "Nature" 251 (1974) pp. 156-158

(77) Pessina A., Brambilla P., Villa S. und Mocarelli P.: CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascites fluid "Oncology" 39 (1982) pp. 391-395

(78) Peter J., Gal F., Sugar J. und Medgyesi G.: Rat lymphoid leukemia of T cell type induced by 7,12 dimethylbenzanthracene. "Oncology" 39 (1982) pp. 113-117

(79) Revell S.H.: A new hypothesis for the interpretation of chromatid aberrations and its relevance to theories for the mode of action of chemical agents. "Annals New York Academic Science" 68 (1958) pp. 802-807

(80) Rice J.M., Joshi S.R., Shenefelt R. und Wenk M.L.: Carcinogenesis: Polynuclear aromatic hydrocarbons Vol 3 (Freudenthal R. and Jones P.W., eds.) Raven Press New York (1978) pp. 413-422

(81) Risser R.: Abelson antigen is expressed on hematopoietic spleen colony-forming cells from mice carrying the AV-2S-sensitivity gene. "Proceedings National Academic Science USA" 76 (1979) pp. 5350-5354

(82) Rohrschneider L.R.: Adhesion plaques of Rous Sarkoma Virus-transformed cells contain the src gene product. "Proceedings National Academic Science USA" 77 (1980) pp. 3514-3518

(83) Sânchez-Fayos J., Outeirino J., Fernândez-Ranada J.M. und Calabuia M.T.: Kinetic behavior of "pathological" myeloblasts and "normal" erythroblasts in acute granulocytic leukemia. "Oncology" 40 (1983) pp. 39-42

(84) Sarrif A.M., McCarthy K.L., Nesnow S. und Heidelberger C.: Separation of glutathion-S-transferase activities with epoxides from the mouse liver h-protein, a major polycyclic hydrocarbon-binding protein. "Cancer Research" 38 (1978) pp. 1438-1443

(85) Schmid F.A., Pena R.C., Robinson W. und Tarnowski G.S.: Toxicity of intraperitoneal injections of 7,12 dimethylbenzanthracene in inbred mice. "Cancer Research" 27 Part 1 (1967) pp. 558-562

(86) Schlede E., Kuntzman R. und Conney A.H.: Stimulatory effect of benzpyrene and phenobarbital pretreatment on the biliary excretion of benzpyrene metabolites in the rat. "Cancer Research" 30 (1970) pp. 2898-2904

(87) Schurr P.E.: Composition and preparation of experimental intravenous fat emulsions. "Cancer Research" 29 (1969) pp. 258-260

(88) Sefton B.M., Hunter T., Ball E.H. und Singer S.J.: Vinculin: A cytoskeletal target of the transforming protein of Rous Sarcoma Virus. "Cell" 24 (1981) pp. 164-174

(89) Seidel H.J.: The effect of dimethylbenzanthracene on murine hematopoiesis. "Zeitschrift für Krebsforschung und klinische Onkologie" 89 (1977) pp. 221-229

(90) Shih C., Shilo B.Z., Goldfarb M.P., Dannenberg A. und Weinberg R.A.: Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. "Proceedings National Academic Science USA" 76 (1979) pp. 5714-5718

(91) Siegers M.P., Feinendegen L.E., Lahiri S.K. und Cronkite E.P.: Relative number and proliferation kinetics of hemopoietic stem cells in the mouse. "Blood Cells" 5 (1979) pp. 211-236

(92) Sims P.: Qualitative and quantitative studies on the metabolism of a series of aromatic hydrocarbons by rat liver preparations. "Biochemical Pharmacology" 19 (1970) pp. 795--818

(93) Slaga T.J., Bowden G.T., Scribner J.D. und Boutwell R.K.: Dose-response studies on the ability of 7,12 DMBA and benzanthracene to initiate skin tumors. "Journal National Cancer Institutes" 53 (1974) pp. 1337-1340

(94) Slaga T.J., Gleason G.L., Hills G., Ewald L., Fu P.P., Lee M.M. und Harvey R.G.: Comparison of the skin tumor-initiating activities of dihydriols and diol-epoxides of various polycyclic aromatic hydrocarbons. "Cancer Research" 40 (1980) pp. 1981-1984

(95) Somoggi A. und Kovacs K.: Dimethylsulfoxide, a convenient solvent of 7,12 dimethylbenzanthracene for intravenous injection. "Cancer Research" 30 (1970) pp. 1958-1960

(96a) Sporn M.B., Todaro G.J.: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. "New English Journal of Medicine" 303 (1980) pp. 878-880

(96b) Steinheder G., Bertoncello I. und Seidel H.J.: Characterisation of early leucemic cells in spleen and bone marrow of Friend Virus infected mice. "Experimental Hematology" Vol 8 No 6 (1980) pp. 779-787

(97) Sugiyama T., Kurita Y. und Nishizuka Y.: Biologic studies on 7,12 dimethylbenzanthracene-induced rat leukemia with special reference to the specific chromosomal abnormalities. "Cancer Research" 29 (1969) pp. 1117-1124

(98) Sugiyama T.: Specific vulnerability of the largest telocentric chromosome of rat bone marrow cells to 7,12 dimethylbenzanthracene. "Journal of National Cancer Institutes" 47 (1971) pp. 1267-1275

(99) Sydnor K.L. und Flesher J.W.: Comparative biological activities of 7,12 DMBA, 7-hydroxymethyl-12-methylbenzanthracene, 7,12-dihydroxymethylbenzanthracene and 4-methoxy-7,12-dimethylbenzanthracene in the Sprague Dawley female rat. "Cancer Research" 29 (1969) pp. 403-408

(100) Tamulski T.S., Morreal C.E. und Dao T.L.: Comparative metabolism of 7,12 DMBA in liver and mammary tissue. "Cancer Research" 33 (1973) pp. 3117-3122

(101) Till J.E. und McCulloch E.A.: A direct measurement of the radiation sensivity of normal mouse bone marrow cells. "Radiation Research" 14 (1961) pp. 213-222

(102) Toksöz P., Dexter T.M., Lord B.I., Wright E.G. und Lajtha L.G.: The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. Stimulation and inhibition of the stem cell proliferation. "Blood" Vol 55 (1980) pp. 931-936

(103) Uematsu K.: Early changes of hematopoietic tissues in mice treated with intravenous pulse-doses of 7,12 dimethylbenzanthracene. "Acta Pathologica Japan" 31 (5) (1981) pp. 799-814

(104) Wangenheim K.H.v.: A mechanism for the endocellular control of cell differentiation and cell proliferation. "Journal theoretic Biology" 59 (1976) pp. 205-222

(105) Wangenheim K.H.v. und Howard Al.: Different modes of cell sterilization: Cell killing and early differentiation. "Radiation Research" 73 (1978) pp. 288-302

(106) Wangenheim K.H.v., Cronkite E.P., Peterson H.P., Hübner, G.E. und Feinendegen L.E.: Persisting radiation effect in the hematopoietic stem cell compartment of mice (noch unveröffentlicht)

(107) Wangenheim K.H.v., Peterson H.P. und Feinendegen L.E.: Long-Term residual radiation effect in the mürine hematopoietic stem cell compartiment (noch unveröffentlicht)

(108) Washawsky D., Kerms E., Bissel M.J. und Calvin M.: Characterization of a photoproduct of 7,12 dimethylbenzanthracene and its effects on chickembryo cells in culture. "Biochemical Journal" 164 (1977) p. 481

(109) -Waterfield M.D., Scrace G.T., Whittle N., Stroobant P., Johnsson A., Wasreson A., Westermark B., Heldin C.H., Huang J.S. und Deuel T.F.: Platelet-derived growth factor protein p28-sis of Simian Sarcoma Virus. "Nature" 304 (1983) pp. 35-39

-Weiss R.: Oncogenes and growth factors. "Nature" 304 (1983) p. 12

(110) Wiener F., Spira J., Ohno Sh., Haran-Ghera N. und Klein G: Chromosome changes (trisomy 15) in murine T-cell leukemia induced by 7,12 dimethylbenzanthracene. "International Journal of Cancer" 22 (1978) pp. 447-453

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 29. Februar 1956 als Sohn des jetzigen Oberstudiendirektors Alfred Feldges und seiner Ehefrau Hildegard, geborene Osterried in Mönchengladbach geboren. Ostern 1962 wurde ich in Rheydt (Mönchengladbach 2 seit 1975) eingeschult und besuchte von Ostern 1966 an das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Mönchengladbach 1. Am 27. Mai 1974 bestand ich dort die Reifeprüfung. Anfang Juli 1974 erfolgte die Einberufung zur Bundeswehr. Am 31. März 1976 beendete ich den Bundeswehrdienst und leistete eine etwa einjährige Voluntärzeit in einer Apotheke in Mönchengladbach ab.

Anfang September 1977 schrieb ich mich bei der medizinischen Fakultät der Reichsuniversität Gent (Belgien) ein und studierte dort Humanmedizin. Die beiden ersten Studienjahre schloß ich mit Erfolg ab.

Am 29. Oktober 1979 schrieb ich mich bei der medizinische Fakultät der Universität Düsseldorf ein, um dort das Medizinstudium fortzusetzen.

Am 24. März 1981 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung schloß ich am 25. März 1982 mit Erfolg ab. Zur Zeit studiere ich im sechsten klinischen Semester an der Universität Düsseldorf.